

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 558**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2007** E 13162010 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024** EP 2650305

54 Título: **PC5 como enzima de procesamiento de propéptido de factor IX**

30 Prioridad:

24.03.2006 US 785421 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.11.2024

73 Titular/es:

**BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (100.0%)
225 Second Avenue
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**PETERS, ROBERT T. y
BITONTI, ALAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 987 558 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

PC5 como enzima de procesamiento de propéptido de factor IX

5 INTRODUCCIÓN

El factor IX (FIX) es un zimógeno monocatenario de 55 kDa de una serina proteasa codificada en el cromosoma X de los seres humanos, que es un componente importante de la vía intrínseca de la cascada de coagulación sanguínea. La deficiencia de FIX funcional provoca hemofilia B, también conocida como enfermedad de Christmas. Se informa que la hemofilia B se produce en 1 de cada 100 000 nacimientos masculinos y, cuando no se trata, está asociada con morbilidad grave y crónica resultante de hemorragias incontroladas en músculos, articulaciones y cavidades corporales después de lesión. Hasta recientemente, los tratamientos para la deficiencia de FIX han incluido la administración de FIX natural preparado a partir de plasma derivado de combinaciones de donadores de sangre. Dichos tratamientos portan riesgos asociados de infección con virus transmitidos por la sangre, incluyendo virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la hepatitis C (VHC), así como trombosis y embolia indeseadas. Más recientemente, ha llegado estar disponible en el mercado una preparación de FIX recombinante (BeneFIX[®], Wyeth).

Se requieren determinadas modificaciones postraduccionales para la actividad normal de FIX. FIX se expresa como un polipéptido precursor que requiere procesamiento postraducciona para producir FIX maduro. En particular, el polipéptido precursor de FIX requiere gamma carboxilación dependiente de vitamina K de determinados residuos de ácido glutámico en el denominado dominio de gamma-carboxiglutamato (Gla) y escisión del propéptido (véase la figura 1). El propéptido es una secuencia de 18 residuos aminoácidos N terminal al dominio Gla. El propéptido se une a la gamma carboxilasa dependiente de vitamina K y después, *in vivo*, se escinde del polipéptido precursor de FIX por una proteasa endógena, muy probablemente PACE (enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados), también conocida como furina y PCSK3. Sin la gamma carboxilación dependiente de vitamina K, el dominio Gla no puede unirse a calcio para asumir la conformación correcta necesaria para anclar la proteína a superficies fosfolípicas cargadas negativamente, haciendo de ese modo que el factor IX no sea funcional. La inhibición de la carboxilación dependiente de vitamina K por antagonistas de vitamina K, tal como warfarina, es una forma común de tratamiento anticoagulante. Incluso si se carboxila, el dominio Gla también depende de la escisión del propéptido para la función apropiada, ya que el propéptido retenido interfiere con los cambios conformacionales del dominio Gla necesarios para la unión óptima a calcio y fosfolípido. Por tanto, las modificaciones postraduccionales requeridas del polipéptido precursor de FIX incluyen tanto gamma carboxilación de determinados residuos de ácido glutámico por gamma carboxilasa dependiente de vitamina K como escisión del propéptido de FIX, muy probablemente por PACE, para producir FIX maduro.

El FIX maduro debe activarse por factor XI activado para producir factor IXa. En la vía intrínseca, FIX se asocia con un complejo con factor VIII activado, factor X, calcio y fosfolípido, en donde FIX se activa por factor XIa, y después el factor IXa a su vez activa el factor X en concierto con factor VIII activado. Como alternativa, los factores IX y X pueden ambos activarse por factor VIIa en complejo con tromboplastina tisular lipídica, que se ha generado mediante la vía extrínseca. El factor Xa entonces participa en la vía común final por la que la protrombina se convierte en trombina, que a su vez convierte fibrinógeno en fibrina.

Hasta ahora, el procesamiento postraducciona *in vitro* del polipéptido precursor de FIX, coherente con los que se sabía acerca del procesamiento *in vivo*, ha dependido de PACE para lograr la escisión del propéptido de FIX. PACE es un miembro de una familia de al menos media docena de serina proteasas de mamífero similares de subtilisina/Kex2p conocidas como proproteína convertasas (PC). PACE se encontró usando homología de secuencia con KEX2, una enzima en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la primera en identificarse como una endoproteasa implicada en el procesamiento de precursores. Posteriormente, se han identificado otros miembros de la familia de PC y se ha encontrado que tienen grados variables de identidad de secuencia y diferentes especificidades de sustrato.

El documento EP 0246709 describe secuencias parciales de ADNc y de aminoácidos de furina (es decir, PACE).

Las secuencias completas de ADNc y aminoácidos de furina humana (es decir, PACE) se publicaron en 1990. Van den Ouweland AM *et al.* (1990) Nucleic Acids Res. 18:664; errata en: Nucleic Acids Res. 18:1332 (1990).

La patente de Estados Unidos n.º 5.460.950, expedida a Barr *et al.*, describe PACE recombinante y la coexpresión de PACE con un polipéptido precursor de sustrato de una proteína heteróloga para mejorar la expresión de la proteína heteróloga activa y madura. En un aspecto, el polipéptido precursor es un polipéptido precursor de FIX.

La patente de Estados Unidos n.º 5.935.815, expedida a van de Ven *et al.*, asimismo describe furina humana recombinante (es decir, PACE) y la coexpresión de furina con un polipéptido precursor de sustrato de una proteína heteróloga para mejorar la expresión de la proteína heteróloga activa y madura. Los posibles precursores de sustrato divulgados en esta patente incluyen un precursor de factor IX.

Se informa que otros miembros de la familia en la familia de proproteína convertasa (PC) de mamífero similar a subtilisina/Kex2p además de PACE incluyen PC1/PC3, PC2, PC4, PC5/6 (a partir de ahora en este documento

denominada simplemente PC5), PACE4 y LPC/PC7/PC8/SPC7. Aunque estos diversos miembros comparten determinados rasgos estructurales globales conservados, difieren en su distribución en el tejido, localización subcelular, especificidades de escisión y sustratos preferidos. Para una revisión, véase Nakayama K (1997) *Biochem J.* 327:625-35. Similares a PACE, estas proproteína convertasas en general incluyen, empezando desde el extremo amínico, un péptido señal, un propéptido (que puede escindirse autocatalíticamente), un dominio catalítico similar a subtilisina caracterizado por los residuos Asp, His, Ser y Asn/Asp, y un dominio Homo B que es también esencial para la actividad catalítica y caracterizado por una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD). PACE, PACE4 y PC5 también incluyen un dominio rico en Cys, cuya función es desconocida. Además, PC5 tiene isoformas con y sin un dominio transmembranario; estas diferentes isoformas son conocidas como PC5B y PC5A, respectivamente. La comparación entre la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de PACE y las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos de otros miembros de esta familia de proproteína convertasas revela los siguientes grados de identidad: 70 por ciento para PC4; 65 por ciento para PACE4 y PC5; 61 por ciento para PC1/PC3; 54 por ciento para PC2; y 51 por ciento para LPC/PC7/PC8/SPC7. Nakayama K (1997) *Biochem J.* 327:625-35.

Se ha informado de que PACE y PACE4 tienen sustratos parcialmente solapantes, pero distintos. En particular, se ha informado de que PACE4, en notable contraste con PACE, no puede procesar el polipéptido precursor de FIX. Wasley LC *et al.* (1993) *J Biol Chem.* 268:8458-65; Rehemtulla A *et al.* (1993) *Biochemistry.* 32:11586-90.

La patente de Estados Unidos n.º 5.840.529, expedida a Seidah *et al.*, divulga secuencias de nucleótidos y aminoácidos para PC7 humana y la notable capacidad de PC7, en comparación con otros miembros de la familia de PC, de escindir gp160 en gp120 y gp41 del VIH.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de PC5 de roedor se describieron por primera vez como PC5 por Lusson J *et al.* (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6691-5 y como PC6 por Nakagawa T *et al.* (1993) *JBiochem (Tokio)* 113:132-5.

La patente de Estados Unidos n.º 6.380.171, expedida a Day *et al.*, divulga secuencias de nucleótidos y aminoácidos para PC5A humana, la isoforma sin el dominio transmembranario, así como métodos para reducir la reestenosis usando ácidos nucleicos antisentido para inhibir la actividad de PC5.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se explica en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o para diagnóstico.

Se divulga además el contenido general que incluye los diversos aspectos y facetas descritas a continuación.

ANTECEDENTES TÉCNICOS

El contenido se basa, en parte, en el descubrimiento por los autores de la invención de que PC5 es eficaz para procesar el propéptido a partir del polipéptido precursor de FIX. Este descubrimiento fue inesperado porque, como se describe en detalle a continuación, los miembros de la familia de PC muy relacionados con completamente o sustancialmente incapaces de procesar el propéptido a partir del polipéptido precursor de FIX. El contenido se refiere a métodos y composiciones útiles para preparar factor IX maduro, usando PC5 para procesar el polipéptido precursor de FIX. Los métodos y composiciones se refieren a FIX *per se*, así como a polipéptidos y conjugados que contienen FIX.

En un aspecto, el contenido es una célula eucariótica que incluye un primer vector de expresión que codifica una proproteína de factor IX (proFIX), o una proteína de fusión de la misma, y un segundo vector de expresión que codifica una PC5 funcional.

En una faceta de acuerdo con este y otros aspectos del contenido, la PC5 funcional incluye una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO:1, correspondiente a PC5A, una isoforma de PC5 sin un dominio transmembranario.

En una faceta de acuerdo con este y otros aspectos del contenido, la PC5 funcional comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a PC5B, una isoforma de PC5 con un dominio transmembranario.

En una faceta de acuerdo con este y otros aspectos del contenido, el primer vector de expresión codifica proFIX.

En una faceta de acuerdo con este y otros aspectos del contenido, la proteína de fusión es una proteína de fusión de proFIX-compañero de unión de FcRn.

misma por la PC5 funcional, en donde el rendimiento de polipéptido que contiene factor IX maduro se aumenta en comparación con el rendimiento de polipéptido que contiene factor IX maduro producido en condiciones similares sin el procesamiento por la PC5 funcional.

5 En un aspecto, el contenido es un método para producir un polipéptido que contiene factor IX maduro a partir de una proproteína de factor IX (proFIX), o un conjugado de la misma. El método de acuerdo con este aspecto del contenido incluye la etapa de poner en contacto la proFIX o el conjugado de la misma con una cantidad eficaz de PC5 funcional.

En una faceta la proFIX o el conjugado de la misma es proFIX.

10 En una faceta el polipéptido que contiene factor IX maduro es un híbrido de monómero dímico de FIX-Fc. También se proporciona un híbrido de monómero-híbrido de FIX-Fc producido de acuerdo con el método de este aspecto del contenido.

15 En una faceta la proFIX o el conjugado de la misma es una proFIX PEGilada.

En una faceta la proFIX o el conjugado de la misma es una proteína de fusión de proFIX-compañero de unión de FcRn.

20 La fraseología y terminología usadas en este documento son con propósitos de descripción y no deben considerarse limitantes. El uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implica", y variaciones de las mismas en este documento, se entiende que abarca los artículos enumerados después de ello y equivalentes de los mismos, así como artículos adicionales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 Las figuras son únicamente ilustrativas y no se requieren para la habilitación del contenido divulgado en este documento.

30 La figura 1 es un dibujo esquemático de prepro factor IX, que incluye los siguientes dominios: prepéptido (PRE), propéptido (PRO), dominio GlA (GLA), dominio H (H), dominios EGF-B y EGF-A, péptido de activación y dominio catalítico. El factor IX maduro carece de los dominios de prepéptido y propéptido. El factor IX activado maduro (factor IXa) además carece del péptido de activación, y el dominio catalítico permanece asociado con el dominio EGF-A a través de un enlace disulfuro.

35 La figura 2A es un dibujo esquemático de la estructura de un homodímero de FIX-Fc.

La figura 2B es un dibujo esquemático de la estructura de un híbrido de monómero-dímico de FIX-Fc.

40 La figura 3 es un dibujo esquemático de PACE, PACE4, PC7 y PC5A (de la parte superior a la parte inferior, respectivamente), que muestra los siguientes dominios: péptido señal, propéptido, dominio catalítico similar a subtilisina, dominio homo B, dominio rico en Cys y dominio transmembranario (solamente PACE y PC7). Los porcentajes mostrados indican el porcentaje de identidad de aminoácidos con PACE dentro de cada dominio correspondiente.

45 La figura 4 muestra transferencias de Western de FIX y propéptido FIX (SDS-PAGE reductor) de inmunoprecipitaciones en proteína A de FIX-Fc de células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas de forma transitoria, en solitario o con PACE-SOL, PC7-SOL, PC5 o KEX2-SOL.

50 La figura 5 muestra transferencias de Western de FIX y propéptido FIX y el correspondiente gel de SDS-PAGE (todo en condiciones no reductoras) de proteínas purificadas con proteína A de células CHO transfectadas de forma estable con FIX-Fc, Fc, y PACE-SOL o PC7-SOL. MWM, marcador de peso molecular.

55 La figura 6 muestra transferencias de Western de FIX y propéptido FIX (todo en condiciones no reductoras) de inmunoprecipitaciones en proteína A de células CHO transfectadas de forma estable con FIX-Fc, Fc y PC5 (carriles 1-3), o células CHO transfectadas de forma estable con FIX-Fc en solitario (carril 4) o con PACE-SOL (carril 5).

60 La figura 7 muestra transferencias de Western de FIX y propéptido FIX de inmunoprecipitaciones en proteína A de células HEK 293 transfectadas de forma transitoria con FIX-Fc y Fc, sin enzima de procesamiento (carriles 3, "-") o con PC5 (carriles 4-7) o PC7-SOL (carriles 8-11). El FIX-Fc purificado de células CHO transfectadas con (carriles 2) o sin (carriles 1) PACE-SOL se usó como controles. Carriles 12, marcadores de peso molecular.

65 La figura 8 muestra transferencias de Western de FIX (no reductor) y propéptido FIX (reductor) de inmunoprecipitaciones en proteína A de dímico de FIX-Fc, híbrido de monómero-dímico (monómero), y Fc

de células HEK 293 transfectadas de forma transitoria, con KEX2-SOL (carriles 3 y 4). El homodímero de FIX-Fc purificado de células CHO transfectadas con (carril 2) o sin PACE (carril 1) se usó como controles.

5 La figura 9 muestra transferencias de Western de FIX y propéptido FIX y el correspondiente gel de SDS-PAGE (todo en condiciones no reductoras) de híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc purificado (monómero) de células HEK 293 transfectadas de forma estable con FIX-Fc, Fc y PC5. El homodímero de FIX-Fc purificado de células CHO transfectadas con PACE-SOL o PC7-SOL se usó como controles.

10 La figura 10 muestra transferencias de Western de FIX y propéptido FIX (condiciones reductoras) de inmunoprecipitaciones en proteína A de dímero de FIX-Fc, híbrido de monómero-dímero (monómero) y Fc de células HEK 293 transfectadas de forma estable, en solitario (carriles 3 y 4) o con PC7-SOL (carriles 5 y 6). El homodímero de FIX-Fc purificado de células CHO transfectadas con (carril 2) o sin (carril 1) PACE-SOL se usó como controles. Carril 7, patrones de peso molecular.

15 La figura 11 muestra los datos de cartografiado de péptidos que indican la presencia de proFIX-Fc en FIX-Fc purificado producido en CHO sin ninguna enzima de procesamiento, y ausencia de proFIX-Fc de híbrido de monómero-dímero (monómero) de FIX-Fc purificado producido en HEK con PC5. TVFLDHENANKII,NRPKR, SEQ ID NO:17; YGIYTK, SEQ ID NO:19.

20 La figura 12 muestra los datos de cartografiado de péptidos que indican la presencia de proFIX-Fc en FIX-Fc purificado producido en CHO con PC7-SOL, y ausencia de proFIX-Fc de híbrido de monómero-dímero (monómero) de FIX-Fc purificado producido en HEK con PC5. TVFLDHENANKII,NRPKR, SEQ ID NO: 17; YGIYTK, SEQ ID NO: 19.

25 La figura 13 muestra los datos de cartografiado de péptidos que indican la ausencia de propéptido de híbrido de monómero-dímero (monómero) de FIX-Fc purificado producido en HEK con PC5 y de factor IX producido en CHO en solitario. TVFLDHENANKILNRPKR, SEQ ID NO: 17; YGIYTK, SEQ ID NO: 19.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL CONTENIDO

30 El contenido se refiere al menos en parte a composiciones y métodos relacionados con PC5, útiles para la preparación de FIX y conjugados de FIX, incluyendo proteínas de fusión de FIX. En determinadas facetas particulares, la PC5 es PC5A y la proteína de fusión de FIX es un híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc, analizados a continuación.

35 El contenido, en un aspecto, se refiere a una célula eucariótica que incluye un primer vector de expresión que codifica una proproteína de factor IX y un segundo vector de expresión que codifica un polipéptido PC5 funcional. Como se usa en este documento, un polipéptido PC5 funcional se refiere a un polipéptido enzimáticamente activo que comprende al menos un dominio homo B y un dominio catalítico similar a subtilisina de una proproteína convertasa PC5. En una faceta, un polipéptido PC5 funcional se refiere a un polipéptido enzimáticamente activo que comprende al menos un dominio homo B y un dominio catalítico similar a subtilisina de una proproteína convertasa PC5 humana. En una faceta, un polipéptido PC5 funcional se refiere a un polipéptido enzimáticamente activo que comprende al menos un dominio homo B y un dominio catalítico similar a subtilisina de una proproteína convertasa PC5, en donde la PC5 funcional es PC5A. Como se menciona anteriormente, el isómero PC5A carece de un dominio transmembranario. En contraste, un isómero PC5B incluye un dominio transmembranario C terminal. En una faceta, un polipéptido PC5 funcional se refiere a un polipéptido enzimáticamente activo que comprende al menos un dominio homo B y un dominio catalítico similar a subtilisina de una proproteína convertasa PC5, en donde la PC5 funcional es PC5A humana.

50 Una secuencia de aminoácidos para PC5A humana se proporciona como el n.º de acceso a GenBank NP_006191 (reproducido como SEQ ID NO:1).

SEQ ID NO:1

```

MGNGSRCCCP  GRDLLELVLA  LLGGCLLPVC  RTRVYTNHWA  VKIAGGFPEA  NRIASKYGFI   60
NIGQIGALKD  YYHFYHSRTI  KRSVIGSAGT  HSFISMEEKV  EWIQQQVVKK  RPKRDYDFSR  120
AQSTYFNDFK  WPSMWMHCS  DNTHPCQSDM  NIEGAWKRGY  TGKNIYVTIL  DDGIERTHPD  180
LMQNYDALAS  CDVNGNDLDP  MPRVDASNEN  KHGTRCAGEV  AAAANNSHCT  VGIAFNAKIG  240
GVRMLDGDVT  DMVEAKSVSF  NFGVHVIYSA  SWGPDGDKT  VDGEAPLTRQ  AFENGVRMGR  300
RGLGSVFVWA  SGNNGRSKDH  CSCDGYNSI  YTISISSTAE  SGKKEWYLEE  CSSTLATTYS  360
SGESYDKRII  TTDLRQRCTD  NHTGTSASAP  MAAGIALAL  EANPFLTWRD  VQHVIVRTSR  420
AGHLNANDWK  TNAAGFKVSH  LYGFGLMDAE  AMVMEAEKWT  TVPRQHVQVE  STDRQIKTIR  480
PNSAVRSIYK  ASGCSDNPNR  HVNYLERVVY  RITITHERRG  DLAIYLTSPS  GTRSQLLANR  540
LFDHSMEGFK  NWEFMTIHCW  GERAAGDWVL  EYIDTFSQLR  NFKTPGKLKE  WSLVLYGTSV  600
QPYSPTNEFP  KVERFRYSRV  EDPTDDYGT  DYAGPCDFEC  SEVCCDGGGP  DHCMDCLNYY  660
YKLNNTTRIC  VSSCEPGHYH  ADKKRCRKA  PNCESCFGSH  GDQCMSCKYG  YFLNEETNSC  720
VTHCPDGSYQ  DTKKNLCKRC  SENCKTCTEF  HNCTECRDGL  SLQGSRCVS  CEDGRYFNGQ  780
DCQPCHRFCA  TCAGAGADGC  INCTEGYFME  DGRCVQSCSI  SYFPDHSSEN  GYKSCKKCDI  840
SCLTCNGPGF  KNCTSCPSGY  LLDLGMCQMG  AICKDATEES  WAEGGFCLMV  KKNLQQRKV  900
LQQLCCKTCT  FQG                                     913
    
```

5 Con referencia a SEQ ID NO:1, el péptido señal de PC5 abarca los residuos aminoacídicos 1-32, el propéptido PC5 abarca los residuos aminoacídicos 33-114, y la proteína PC5 madura (que empieza con el dominio catalítico similar a subtilisina) abarca los residuos aminoacídicos 115-913. En una faceta, un polipéptido PC5 funcional se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada como SEQ ID NO:1. En una faceta, un polipéptido PC5 funcional se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada como los residuos aminoacídicos 33-913 de SEQ ID NO:1. En una faceta, un polipéptido PC5 funcional se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada como los residuos aminoacídicos 115-913 de SEQ ID NO:1.

10 Debido a la degeneración del código genético, un polipéptido PC5A humano puede estar codificado por cualquier secuencia de nucleótidos adecuada. En una faceta, una secuencia de nucleótidos para PC5A humana se proporciona como los nucleótidos 478-3216 del n.º de acceso a GenBank NM_006200 (reproducido como SEQ ID NO:2). Esta secuencia codifica SEQ ID NO:1 anterior.

15

SEQ ID NO:2

atgggctggy ggagccgctg ctgctgcccg ggacgtttgg aacctgctgtg cgtgctggcg
ctgctcgggg gctgctgct ccccgctgtg cggacgcgcy tctacaccaa ccaactgggca
gtcaaaatcy ccgggggctt cccggaggcc aacctgctgc ccagcaagta cggattcatc
aacataggac agataggggc cctgaaggac tactaccact tctaccatag caggacgatt
aaaaggctag ttatctcgag cagagggacc cacagtttca ttccaatgga accaaagggtg
gaatggatcc aacagcaagt ggtcaaaaag cggacaaaag gggattatga cttcagtcgt
gccagctca cctatttcaa tgatcccaag tggcccagca tgtggtatat gcactgcagt
gacaatacac atccctgcca gtctgacatg aatatcgaag gagcctggaa gagaggctac
acgggaaaga acattgtggt cactatcctg gatgacggaa ttgagagaac ccatccagat
ctgatgcaa actacgatgc tctggcaagt tgcgacgtga atgggaatga cttggaccca
atgctctggt atgatgcaag caacgagaac aagcatyggc ctgctgtgtc tggagaagtg
gcagccgctg caaacaatto gcactgcaca gtccgaattg ctttcaacgc caagatcgga
ggagtgcgaa tgcctggacgy agatgtcacg gacatggttg aagcaaatc agttagcttc
aacccccagc acgtgcacat ttacagcgc agctggggcc cggatgatga tggcaagact
gtggacggac cagccccct caccgggcaa gcccttgaaa acggcgttag aatggggcgg
agaggccctg gctctgtgtt tytttgggca tctggaaatg gtggaaggag caaagaccac
tgctcctgtg atggtacac caacagcate tacaccatct caatcagcag cactgcagaa
agcggaaaga aaccttggtc cctggaagag tgttcaccca cgtcggccac aacctacagc
agcggggagt cctacgataa gaaaatcctc actacagatc tgaggcagcy ttgcacggac
aacacactg ggacgtcagc ctccagcccc atgctgcag gcatcattgc gctggccctg
gaagccaatc cgtttctgac ctggagagac gtacagcatg ttattgtcag gacttccctg
gcccagcatt tgaacgtaa tgactggaaa accaatgctg ctggttttaa ggtgagccat
ctttatggat ttggactgat ggacgcagaa gccatggtga tggaggcaga gaagtggacc
accgttccc gccagcagct gtgtgtggag agcagagacc gacaaatcaa gacaatccgc
cctaacagtg cagtgcctc catctacaaa gcttcaggct gctcggataa ccccaaccgc
cctgtcaact acctggagca cgtcgtgtg cycaaccca tcaaccacc caggagagya
gacctggcga tctacctgac ctgcacctc ggaactaggt ctacgctttt ggccaacagg
ctatttgatc actccatgga agyatcaaa aactgggagt tcatgacct tcatgtctgg
ggagaaagay ctgctggtga ctgggtcctt gaagtttatg atactccctc tcagctaagg
aactttaaga ctccaggtaa attgaaagaa tggcttttgg tectctacgg cacctcctg
cagccatatt caccaccaa tgaatttccg aaagtggac ggttccgcta tagccgagtt
gaagaccca cagacgacta tggcacagag gat tatgcag gtccctgcga cctgagtg
agtgaggtg gctgtgaggy gccagyaaca gaccactgca atgactgttt gcaactact
tacaagctya aaaacaatac caggatctgt gtctccagct gccccctgg ccactaccac

gccgacaaga agcctgctgag gaagtgtgoc cccaactgtg agtctgctt tgggagccat
ggtgaccaat gcatgtccty caaatatgga tactttctga atgaagaaac caacagctgt
gttaactcaact gccctgatgg gtcatatcag gataccaaga aaaaatctty ccggaatgc
agtgaaaact gcaagacatg tactgaattc cataactgta cagaatgtag ggatgggtta
agcctgcagg gateccggtg ctctgtctcc tktgaagatg gacggtatct caacggccag
gactgccagc cctgccaccg cttctgcgcc acttgtgctg ggcaggagc tyatgggtgc
attaactgca cagagggcta cttcatggag gatgggagat gctgacagag ctgtagtatc
agctattact ttgaccactc ttcagagaat ggatacaaat cctgcaaaa atgtgatatc
agttgtttga cgtgcaatgg cccaggatc aagaactgta caagctgccc tagtgggtat
ctcttagact taggaatgtg tcaaatggga gccatttgc aagatgcaac ggaagagfoc
tggggggaag gaggctctg tatgctgtg aaaaagaaca atctgtgcca acggaaggtt
cttcaaccaac tttgctgca aacatgtaca tttcaagc

5 La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PC5 puede contener sustituciones que no afectan a la secuencia de aminoácidos. En una faceta, el nucleótido en la posición 876 del n.º de acceso a GenBank NM_006200

5 puede remplazarse por timidina (T) en lugar de citidina (C), pero conservar el aminoácido Ser 133 (correspondiente a la numeración de aminoácidos en el n.º de acceso a GenBank NP_006191). En una faceta, el nucleótido en la posición 1950 del n.º de acceso a GenBank NM_006200 puede remplazarse por citidina (C) en lugar de timidina (T), pero conservar el aminoácido Ala 491. Obsérvese que este cambio nucleotídico en la posición 1950 elimina un sitio de restricción de HindIII. En una faceta, el nucleótido en la posición 1962 del n.º de acceso a GenBank NM_006200 puede remplazarse por adenina (A) en lugar de guanosina (G), pero conservar el aminoácido Ser 496. En una faceta, la secuencia de nucleótidos que codifica PC5 es como se proporciona a continuación en el ejemplo 3. En facetas adicionales, puede estar presente cualquier combinación de las sustituciones mencionadas anteriormente. En otras facetas adicionales más, también se contemplan tipos similares de sustituciones por el contenido y están dentro de las habilidades de los expertos en la materia prepararlas y usarlas en la práctica del contenido.

15 La secuencia de PC5 también puede contener otros cambios no codificantes a nivel de nucleótidos que pueden encontrarse en la base de datos de SNP. Por ejemplo, en diversas facetas, Leu 16 puede tener una adenina (A) en lugar de una guanosina (G) en la posición del codón 3; Cys 30 puede tener una citosina (C) en lugar de una timidina (T) en la posición del codón 3; Thr 385 puede tener una adenina (A) en lugar de una guanosina (G) en la posición del codón 3; Ser 495 puede tener una adenina (A) en lugar de una guanosina (G) en la posición del codón 3; Pro 623 puede tener una timidina (T) en lugar de una citosina (C) en la posición del codón 3; Cys 767 puede tener una timidina (T) en lugar de una citosina (C) en la posición del codón 3; y cualquier combinación de las mismas. Estos ejemplos no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

20 Como se usa en este documento, una proproteína de factor IX (proFIX) se refiere a cualquier polipéptido de factor IX que incluye al menos un propéptido de factor IX, un dominio Gla y un dominio catalítico de factor IX. El propéptido de factor IX está colocado N terminal adyacente al dominio Gla. En una faceta, la proproteína de factor IX incluye además un prepéptido (secuencia señal) N terminal al propéptido. En una faceta, la proproteína de factor IX es una proproteína de un factor IX humano. Una proproteína de factor IX humano, en una faceta, tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada como el n.º de acceso a GenBank NP_000124, reproducido a continuación como SEQ ID NO:3. En esta secuencia, los residuos aminoacídicos 1-28 representan un prepéptido (secuencia señal); los residuos aminoacídicos 29-46 representan un propéptido; los residuos aminoacídicos 47-86 representan un dominio Gla que contiene doce residuos de ácido glutámico; los residuos aminoacídicos 191-226 representan un péptido de activación; y los residuos aminoacídicos 227-461 representan un dominio catalítico. El péptido de activación se escinde por el factor XIa para producir una cadena pesada y una cadena ligera que se asocian covalentemente por uno o más enlaces disulfuro. Debe apreciarse que, en una faceta, la treonina en el aminoácido 194 en SEQ ID NO:3 puede remplazarse por una alanina.

SEQ ID NO:3

```

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL    60
ERECMEEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGSCKD DINSYECWCF    120
FGFEGKNCGL DVTGNIKNGR CEQFCKNSAD NRVVCSCTEG YRLAENQKSC EFAVFFPCGR    180
VSVSQTSKLT RAETVFFDQVD YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW    240
QVVLNGKVDA FCGGSIVNEK NIVTAANCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNVIKII    300
PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIAQKE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF    360
HKGRSALVLQ YLRVFLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFN EGRDSCQGD SGCPHVTEVE    420
35 GTSFLTGIIS WGECAMKGGK YGIYTKVSRV VNWIKERTKL T                                461
    
```

40 Debido a la degeneración del código genético, una proproteína de factor IX humano puede estar codificada por cualquier secuencia de nucleótidos adecuada. En una faceta, una secuencia de nucleótidos que codifica una proproteína de factor IX humano se proporciona como los nucleótidos 30-1412 del n.º de acceso a GenBank NM_000133, reproducido a continuación como SEQ ID NO:4. Esta secuencia codifica SEQ ID NO:3 anterior.

SEQ ID NO:4

```

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcaccaccat ctgcctttta
ggatatactac tcagtgtctga atgtacagtt tttcttgatc atgaasacgc caacaaaatt
ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaacott
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag caccgagaagt ttttgaaaac
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagstcagtg tgagtccaat
ccatgtttta atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc
tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga
tgcgagcagtt tttgtaaaa tagtgcctgat aacaaggtgg ttigtccctg tactgagggg
tatcgacttg cagaaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgcattttcc atgtggaaga
gtttctggtt caaaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac
tatgtaaatt ctactgaagc tgsaaccatt ttggataaca tcaactcaag cacccaatca
tttaatgact tcaactcgggt tgttgggtga gaagatgcca aaccaggtca attccttgg
caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa
tggattgtaa ctgctgccc ctgtgttgaa actggtgkta aaattacagt tctcgcaggt
gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaasagc gaaatgtgat tgaattatt
ctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacascn atgacattgc ccttctggaa
ctggacgaac ccttagtget aaacagctac gttacacctt tttgcatgct tgacaaggaa
tacaagaaca tcttctcaa atttggatct ggcctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc
caaaaagggg gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc
acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat
gaaggaggtg gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa
gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa
tatggaatat ataccaaggt atcccgggtat gtcactgga ttaaggaaaa aacaaagctc
act
    
```

5 Como se usa en este documento, polipéptido se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del polímero; por tanto, se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas dentro de la definición de polipéptido.

10 En una faceta, un polipéptido es un polipéptido monocatenario. Como se usa en este documento, una proteína puede ser un polipéptido monocatenario o puede incluir más de un polipéptido monocatenario. También como se usa en este documento, el término polipéptido puede incluir polipéptidos que tienen una o más modificaciones posexpresión, por ejemplo, glucosilación, acetilación, fosforilación, pegilación, adición de un resto lipídico o la adición de cualquier molécula orgánica o inorgánica. Los aminoácidos incluyen específicamente, aunque sin limitación, los denominados aminoácidos de origen natural comunes. Estos incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Dentro de la definición de polipéptido se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales) y polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural.

15 En una faceta, un polipéptido es una proteína de fusión.

20 Pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y proteínas o componentes de las mismas del contenido, o las correspondientes secuencias de ADN que codifican dichos polipéptidos y proteínas, sin pérdida apreciable de su actividad biológica, función o utilidad. Derivados, análogos o mutantes resultantes de dichos cambios y el uso de dichos derivados están dentro del alcance del presente contenido.

25 Como apreciarán los expertos en la materia, los sustitutos para un aminoácido pueden seleccionarse de otros miembros de una clase a la que pertenece el aminoácido (véase, por ejemplo, la tabla 1). Además, diversos aminoácidos se sustituyen comúnmente con aminoácidos neutros, por ejemplo, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Véase, por ejemplo, MacLennan DH *et al.*, Acta Physiol Scand Suppl. 643:55-67 (1988); Sasaki N *et al.*, Adv Biophys. 35:1-24 (1998).

Tabla 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustitución típica
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustitución típica
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Lys
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, ácido 1,4-diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, He	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, norleucina	Leu

Una proteína de fusión, como se usa en este documento, se refiere a una proteína de fusión recombinante que abarca al menos dos polipéptidos heterólogos. Una proteína de fusión recombinante se refiere a una proteína codificada por una sola secuencia de nucleótidos derivada de al menos dos secuencias de nucleótidos heterólogas unidas covalentemente entre sí, de modo que la secuencia codificante de cada secuencia de nucleótidos componente se traduzca en su pauta de lectura apropiada. Los métodos generales para preparar construcciones de ADN recombinante son bien conocidos en la técnica. Como se divulga a continuación, una proteína de fusión es un tipo de conjugado como se usa en este documento. Las proteínas de fusión, en una faceta, pueden modificarse opcionalmente para que incluyan uno o más glúcidos u otros restos no proteínicos.

Como se describe en mayor detalle a continuación, una proteína de fusión puede incluir opcionalmente un resto conector entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos componentes. El resto conector opcional puede incluir, pero no necesariamente, uno o más aminoácidos. En una faceta, el resto conector opcional es un péptido de al menos dos residuos aminoácidos de longitud.

Las proteínas de fusión del contenido en general incluyen proteínas de fusión de proFIX. En una faceta, la proteína de fusión de proFIX es una proteína de fusión de proFIX-albúmina. Una proteína de fusión de proFIX-albúmina, como se usa en este documento, se refiere a una proteína de fusión que incluye un polipéptido proFIX unido covalentemente a albúmina. El polipéptido proFIX puede fusionarse en el extremo N terminal de un polipéptido de albúmina o en el extremo C terminal de un polipéptido de albúmina, con la condición de que el componente proFIX de la proteína de fusión de proFIX-albúmina pueda procesarse mediante PC5 enzimáticamente activa para producir un polipéptido que contiene FIX maduro, como se describe en este documento. En una faceta, el polipéptido proFIX es un polipéptido proFIX humano y el polipéptido de albúmina es un polipéptido de albúmina humana.

En otra faceta, la proteína de fusión de proFIX es una proteína de fusión de proFIX-transferrina. Una proteína de fusión de proFIX-transferrina, como se usa en este documento, se refiere a una proteína de fusión que incluye un polipéptido proFIX unido covalentemente a transferrina. El polipéptido proFIX puede fusionarse en el extremo N terminal de un polipéptido transferrina o en el extremo C terminal de un polipéptido transferrina, con la condición de que el componente proFIX de la proteína de fusión de proFIX-transferrina pueda procesarse mediante PC5 enzimáticamente activa para producir un polipéptido que contiene FIX maduro, como se describe en este documento. En una faceta, el polipéptido proFIX es un polipéptido proFIX humano y el polipéptido de transferrina es un polipéptido de transferrina humana.

Las proteínas de fusión de proFIX presentadas del contenido incluyen proteínas de fusión de proFIX que pueden unirse específicamente por un receptor de Fc neonatal (FcRn). Estas proteínas de fusión de proFIX presentadas incluyen una proteína de fusión de proFIX-compañero de unión de FcRn, una proteína de fusión de proFIX-Fc, un homodímero de proFIX-Fc y un híbrido de monómero-dímero de proFIX-Fc (véase, por ejemplo, la figura 2).

Como se usa en este documento, FcRn o, de forma equivalente, receptor FcRn, se refiere a receptor de Fc neonatal. FcRn se describió por primer vez como un receptor de enterocitos para IgG en ratas y ratones neonatales. Este receptor se une a la parte Fc de inmunoglobulina G (IgG) y transporta la IgG por transcitosis en una dirección de luminal a serosa, es decir, desde la luz del intestino hasta el intersticio, en un proceso que se cree que es responsable del suministro de IgG materna al neonato. El transporte mediado por FcRn de IgG se cree que es subyacente a la adquisición pasiva de IgG durante el periodo de lactancia del recién nacido. Posteriormente se descubrió que FcRn se expresa ampliamente en múltiples tipos de epitelios humanos, no solamente en recién nacidos, sino también en adultos. El FcRn ha sido la base de la administración sistémica de varias moléculas proporcionadas como conjugados con compañeros de unión de FcRn. Véanse las patentes de Estados Unidos n.º 6.030.613, 6.086.875 y 6.485.726, y la solicitud de patente internacional publicada WO 03/077834.

El FcRn ahora está bien caracterizado. El FcRn se ha aislado para varias especies de mamíferos, incluyendo seres humanos. Las secuencias de las moléculas FcRn humana, de rata y de ratón pueden encontrarse, por ejemplo, en Story CM *et al.* (1994) J Exp Med. 180:2377-81. El FcRn se une a IgG (pero no a otras clases de inmunoglobulina tales como IgA, IgD, IgM e IgE) a un pH relativamente menor, transporta activamente la IgG de forma transcelular en una dirección luminal a serosa, y después libera la IgG al un pH relativamente más alto encontrado en los líquidos intersticiales. Como reconocerán los expertos en la materia, el FcRn puede aislarse por clonación o purificación por afinidad usando, por ejemplo, anticuerpos monoclonales. Dicho FcRn aislado entonces puede usarse para identificar y aislar compañeros de unión de FcRn.

Como se usa en este documento, un compañero de unión de FcRn significa cualquier entidad que pueda unirse específicamente por un FcRn. El compañero de unión de FcRn, en determinadas facetas, puede incluir, aunque sin limitación, IgG completa, un fragmento Fc de IgG y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa para el FcRn. la región de la parte Fc de IgG que se une al FcRn se ha descrito en función de la cristalografía de rayos X (Burmeister WP *et al.*, Nature 372:379-83 (1994)). El área de contacto principal de Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Siguiendo la convención de numeración para aminoácidos basada en Kabat *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, MD, 1991), contactos potenciales son los residuos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 en CH2 y 385-387, 428 y 433-436 en CH3. Estos sitios son distintos de los identificados por comparación de subclases o por mutagénesis dirigida al sitio como importantes para la unión de Fc a FcγRI y FcγRII de leucocitos. Los contactos de Fc - FcRn anteriores están todos dentro de una sola cadena pesada de Ig. Se ha observado previamente que dos FcRn pueden unirse a una sola molécula Fc (homodimérica). Los datos de cristalografía sugieren que, en dicho complejo, cada molécula de FcRn se une a un solo polipéptido del compañero de unión de FcRn de homodímero de Fc. Por tanto, en una faceta, un fragmento de IgG que incluye la región de unión completa para el FcRn incluye al menos el área de contacto principal de Fc con el FcRn cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3.

En una faceta, un compañero de unión de FcRn es un compañero de unión de FcRn distinto de IgG completa. En una faceta, un compañero de unión de FcRn es un compañero de unión de FcRn distinto de IgG humana completa.

En una faceta, un compañero de unión de FcRn es un fragmento Fc de IgG. Excepto que se especifique de otro modo en este documento, un fragmento Fc de IgG es un homodímero de fragmentos polipeptídicos de la cadena pesada de IgG (es decir, polipéptidos Fc) que, cuando se asocian, constituyen conjuntamente un fragmento de IgG completa que incluye los dominios de bisagra, CH2 y CH3 de IgG. Un fragmento Fc de IgG corresponde a un fragmento proteolítico de IgG que contiene solamente las regiones del extremo carboxílico unidas por disulfuro de las dos cadenas pesadas de IgG. Los fragmentos Fc de IgG median funciones efectoras al unirse a determinados receptores de Fc y la proteína del complemento C1q, y tienen que distinguirse de los fragmentos Fab de unión a antígeno de IgG. En una faceta, un compañero de unión de FcRn es un fragmento Fc de una IgG humana, es decir, un Fc gamma humano. En una faceta particular, un compañero de unión de FcRn es un fragmento Fc de una IgG1 humana (es decir, Fcγ1). En una faceta, cada polipéptido de un fragmento Fc (es decir, cada polipéptido Fc) de una IgG humana tiene una secuencia de aminoácidos como se proporciona por SEQ ID NO:5, correspondiente a los números de residuos aminoácidos de Kabat 221-447.

SEQ ID NO:5

```
DKTHTCPFCP APELLGGPSV FLPPFKPKDT LMSRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD    60
GVEVHNAKTK FREQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA FIEKTISKAK    120
GQPREPQVYF LPPSRDELTK NVVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPFVLDL    180
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVEFSCSVME ALHNNYTKQS LSLSPGK                    227
```

En una faceta, un ácido nucleico que codifica un polipéptido Fc de IgG1 humana tiene una secuencia proporcionada por el n.º de acceso a GenBank Y14735 (SEQ ID NO:62):

SEQ ID NO:62

```

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tccctgggggg accgtcagtc
ttcctctctc ccccaaaacc caaggacacc ctcctgatct cccggacccc tgaggtcaca
tgctgtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtcaca cagcaactac
cgtgtggtca ggcctctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caagccaaa
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag
aaccaggtca gctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag
tgggagagca atgggcagcc ggagaaacac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc
gacggctctt tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
aacgtctctt catgctcctg gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
ctctccctgt ctccgggtaa a
    
```

5 La secuencia de nucleótidos del polipéptido Fc puede modificarse para que incorpore o elimine sitios para endonucleasas de restricción, mientras se conserva la secuencia de aminoácidos. En una faceta, los codones para A231, P232 y E233 se modifican de GCA, CCT, GAA a GCT, CCG, GAA para incorporar un sitio de restricción BspEI sin alterar la secuencia de aminoácidos expresada. En otra faceta, los codones para G236, G237 y P238 se modifican de GGG, GGA, CCG a GGC, GGA, CCG para incorporar un sitio de restricción RsrII mientras se conserva la secuencia de aminoácidos.

10 Un polipéptido Fc de IgG puede modificarse de acuerdo con procedimientos bien reconocidos, tales como mutagénesis dirigida al sitio y similares para producir IgG modificada o fragmentos Fc o partes de los mismos que se unirán por FcRn. Dichas modificaciones incluyen modificaciones lejos de los sitios de contacto de FcRn, así como modificaciones dentro de los sitios de contacto que conservan o incluso potencian la unión al FcRn. Por ejemplo, los siguientes

15 residuos aminoácidos individuales (convención de numeración de Kabat) en Fc de IgG1 humana (Fcγ1) pueden sustituirse sin pérdida significativa de afinidad de unión de Fc por FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A y K447A, donde, por ejemplo, P238A representa prolina natural sustituida por alanina en el número de posición 238. Como un ejemplo, una faceta

25 específica incorpora la mutación N297A, que elimina el sitio de N-glucosilación altamente conservado. Además de alanina, pueden sustituirse otros aminoácidos en el lugar de aminoácidos naturales en las posiciones especificadas anteriormente. Pueden introducirse mutaciones individualmente en Fc dando lugar a más de cien compañeros de unión de FcRn distintos de Fc natural. Además, pueden introducirse conjuntamente combinaciones de dos, tres o más de estas mutaciones individuales, dando lugar a cientos más de compañeros de unión de FcRn. Además, uno de los polinucleótidos de un fragmento Fc dimérico u otro compañero de unión de FcRn dimérico puede incluir una mutación,

30 mientras los otros no, o ambos pueden mutarse, pero con diferentes mutaciones. Cualquiera de las mutaciones descritas en este documento, incluyendo N297A, puede usarse para modificar Fc.

Determinadas mutaciones anteriores pueden conferir nueva funcionalidad en el compañero de unión de FcRn. Por ejemplo, una faceta incorpora N297A, que elimina un sitio de N-glucosilación altamente conservado. El posible efecto

35 de esta mutación es reducir la inmunogenia, potenciando de ese modo la semivida en circulación del compañero de unión de FcRn, y hacer que el compañero de unión de FcRn sea incapaz de unirse a otros receptores de Fc, incluyendo FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA, sin comprometer la afinidad por FcRn. Routledge EG *et al.* (1995) *Transplantation* 60:847-53; Friend PJ *et al.* (1999) *Transplantation* 68:1632-7; Shields RL *et al.* (1995) *J Biol Chem* 276:6591-604. Como ejemplo adicional de la nueva funcionalidad que surge de las mutaciones descritas anteriormente, puede

40 aumentarse la afinidad por FcRn más allá de la natural en algunos casos. Esta afinidad aumentada puede reflejar un tasa "de asociación" aumentada, un tasa de "disociación" disminuida, o tanto una tasa "de asociación" aumentada como una tasa de "disociación" disminuida. Las mutaciones que se ha informado que confieren una afinidad aumentada por FcRn incluyen T256A, T307A, E380A y N434A. Shields *et al.* (2001) *J Biol Chem* 276:6591.

45 Además, al menos tres receptores de Fc gamma humanos parecen reconocer un sitio de unión en IgG dentro de la región de bisagra inferior, en general los aminoácidos 234-237. Por lo tanto, otro ejemplo de la nueva funcionalidad y la posible inmunogenia disminuida puede surgir de mutaciones en esta región, como, por ejemplo, reemplazando los aminoácidos 233-236 de IgG1 humana (ELLG; SEQ ID NO: 6) en la secuencia correspondiente de IgG2 (PVA, con eliminación de un aminoácido). Se ha informado de que FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que median diversas funciones

efectoras, no se unirán a IgG1 cuando se hayan introducido dichas mutaciones. Ward *et al.* (1995) *Ther Immunol* 2:77-94; Armour KL *et al.* (1999) *Eur J Immunol* 29:2613-24.

5 Como se usa en este documento, una proteína de fusión de proFIX-compañero de unión de FcRn se refiere a una proteína de fusión que incluye un polipéptido proFIX unido covalentemente a un polipéptido compañero de unión de FcRn. El componente de polipéptido proFIX puede procesarse por PC5 para producir una forma madura de FIX que, a su vez, puede activarse por factor XIa para producir un polipéptido FIXa activado. El componente de polipéptido compañero de unión de FcRn puede ser cualquier polipéptido adecuado que pueda unirse específicamente por FcRn. En determinadas facetas, el polipéptido compañero de unión de FcRn es un polipéptido Fc de IgG o un polipéptido Fc de una IgG humana. La unión entre el componente de polipéptido proFIX y el componente de polipéptido compañero de unión de FcRn puede ser directa o puede ser indirecta mediante un conector.

15 Como se usa en este documento, una proteína de fusión de proFIX-Fc se refiere a una proteína de fusión que incluye un polipéptido proFIX unido covalentemente a un polipéptido Fc. El componente de polipéptido proFIX puede procesarse por PC5 para producir una forma madura de FIX que, a su vez, puede activarse por factor XIa para producir un polipéptido FIXa activado. El componente de polipéptido Fc puede ser cualquier polipéptido Fc adecuado que pueda unirse específicamente por FcRn. En determinadas facetas, el polipéptido Fc es un polipéptido Fc de IgG o un polipéptido Fc de una IgG humana. La unión entre el componente de polipéptido proFIX y el componente de polipéptido Fc puede ser directa o puede ser indirecta mediante un conector.

20 Las proteínas de fusión del contenido pueden incluir diversas estructuras diméricas formadas a través de dimerización de polipéptidos idénticos o no idénticos. Por tanto, las proteínas de fusión diméricas del contenido pueden incluir homodímeros y heterodímeros. En una faceta, la proteína de fusión del contenido comprende una primera cadena polipeptídica que comprende al menos un primer dominio, teniendo dicho primer dominio al menos un compañero de unión específico, y una segunda cadena polipeptídica que comprende al menos un segundo dominio, en donde dicho segundo dominio es un compañero de unión específico de dicho primer dominio. La proteína de fusión, por tanto, comprende un polipéptido que puede dimerizar con otro polipéptido debido a la interacción del primer dominio y el segundo dominio. Los métodos de dimerización de anticuerpos usando dominios heterólogos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.807.706 y 5.910.573; Kostelny *et al.* (1992) *J Immunol* 148:1547.

35 La dimerización puede producirse por la formación de un enlace covalente, o como alternativa un enlace no covalente, por ejemplo, interacción hidrófoba, fuerzas de Van der Waals, interdigitación de péptidos anfífilos tales como, aunque sin limitación, hélices alfa, interacciones entre cargas de aminoácidos que portan cargas opuestas, tales como, aunque sin limitación, lisina y ácido aspártico, arginina y ácido glutámico. En una faceta, la dimerización implica un haz de hélices que comprende una hélice, un giro y otra hélice. En otra faceta, la dimerización implica una cremallera de leucina que comprende un péptido que tiene varios aminoácidos repetitivos en que cada séptimo aminoácido es un residuo de leucina. En una faceta, los compañeros de unión específicos son Fos y Jun. Véase, Branden *et al.* (1991) *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Nueva York.

40 En otra faceta, la dimerización está mediada por un enlace químico (véase, por ejemplo, Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81). En esta faceta, inmunoglobulinas intactas, o proteínas de fusión compuestas de al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, se escinden para generar fragmentos de la cadena pesada. Estos fragmentos se reducen en presencia de un agente formador de complejos con ditiol, tal como arsenito de sodio para estabilizar los ditiolos adyacentes y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos así generados entonces se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de TNB se vuelve a convertir entonces en el fragmento de la cadena pesada tiol por reducción con un agente reductor tal como mercaptoetilamina y entonces se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de TNB para formar un dímero.

50 Como se usa en este documento, un homodímero de proFIX-Fc se refiere a un dímero unido covalente o no covalentemente formado entre dos polipéptidos de proFIX-Fc idénticos. En una faceta, los dos polipéptidos se unen covalentemente entre sí para formar una estructura doble en que los dos polipéptidos se coalinean desde el extremo N hasta el extremo C. En una faceta, los dos polipéptidos se unen covalentemente entre sí a través de uno o más puentes disulfuro formados entre la región de dominio de bisagra de un polipéptido Fc y la región de dominio de bisagra del otro polipéptido Fc, para formar una estructura doble en que los polipéptidos Fc se coalinean desde el extremo N hasta el extremo C. En la figura 2A se proporciona un diagrama que ilustra la estructura de una faceta de un homodímero de proFIX-Fc.

60 Como se usa en este documento, un híbrido de monómero-dímero de proFIX-Fc se refiere a una proteína heterodimérica que incluye una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde la primera cadena polipeptídica incluye un polipéptido proFIX y al menos una parte de una cadena constante de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un FcRn, y en donde la segunda cadena polipeptídica incluye al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un FcRn, pero cuya segunda cadena polipeptídica no incluye un polipéptido proFIX. Por tanto, en este aspecto del contenido, la proteína es monomérica con respecto a proFIX y dimérica con respecto a Fc (por tanto, la expresión "híbrido de monómero-dímero"). Sin embargo, debe apreciarse que, aunque un híbrido de monómero-dímero de proFIX-Fc es heterodimérico ya que las

dos cadenas son distintas, estas moléculas también pueden denominarse "monómero" para abreviar, ya que hay solamente una proFIX biológicamente activa en comparación con las proteínas de fusión de Fc homodiméricas tradicionales. Se hace referencia al documento US 2005/0032174. En una faceta, la parte de una cadena constante de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un FcRn incluye, en cada caso, un dominio de fragmento Fc de IgG. En una faceta, la parte de una cadena constante de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un FcRn es, en cada caso, un dominio de fragmento Fc de IgG. En una faceta, la parte de una cadena constante de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un FcRn incluye, en cada caso, un dominio de fragmento Fc de IgG humana. En una faceta, la parte de una cadena constante de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un FcRn en la primera cadena polipeptídica es idéntica a la parte de una cadena constante de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un FcRn en la segunda cadena polipeptídica. En una faceta, la parte de una cadena constante de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un FcRn en la primera cadena polipeptídica no es idéntica a la parte de una cadena constante de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un FcRn en la segunda cadena polipeptídica. En la figura 2B se proporciona un diagrama que ilustra la estructura de una faceta de un híbrido de monómero-dímero de proFIX-Fc.

Las proteínas de fusión y conjugados del contenido pueden comprender opcionalmente al menos una molécula conectora. Un conector en general puede estar compuesto de cualquier molécula orgánica. En una faceta, el conector es polietilenglicol (PEG). En otra faceta, el conector está compuesto de aminoácidos. Un conector de aminoácido puede comprender 1-5 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 50-100 aminoácidos, 100-200 aminoácidos. Un conector de aminoácido, en una faceta, puede estar codificado por una secuencia de ácido nucleico incorporada en una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión. Un conector de aminoácidos, en una faceta, puede generarse como un péptido sintético aislado, es decir, un péptido producido usando técnicas conocidas de síntesis química (por ejemplo, síntesis en fase sólida) realizadas fuera de una célula. Puede usarse cualquiera de los conectores de aminoácidos descritos en este documento en una proteína de fusión del contenido, por ejemplo, un híbrido de monómero-dímero de proFIX-Fc.

En una faceta, un conector de aminoácidos es el conector de ocho aminoácidos EFAGAAAV (SEQ ID NO:7), en donde E representa ácido glutámico, F representa fenilalanina, A representa alanina, G representa glicina y V representa valina. En una faceta, el conector está codificado por una secuencia de ácido nucleico que está incorporada en una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

Un conector de aminoácidos, en determinadas facetas, puede incluir la secuencia G_n (SEQ ID NO:8), $(GA)_n$ (SEQ ID NO:9), $(GGS)_n$ (SEQ ID NO:10), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:11), o cualquier combinación de las mismas, en donde, en cada caso, G representa glicina, A representa alanina, S representa serina y n puede ser un número entero de 1-10, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Ejemplos de conectores incluyen, aunque sin limitación, GGG, SGGSGGS (SEQ ID NO:12), GGS GG SGG SGG SGG (SEQ ID NO:13), GGS GG SGG SGG SGG SGG (SEQ ID NO:14), GGS GG SGG SGG SGG SGG SGG (SEQ ID NO:15). En una faceta, el conector es GGS GG SGG SGG SGG SGG SGG SGG SGG SGG (SEQ ID NO:16). En una faceta, el conector está codificado por una secuencia de ácido nucleico que está incorporada en una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión. El conector no elimina o disminuye la actividad biológica de la proteína de fusión. Opcionalmente, el conector potencia la actividad biológica de la proteína de fusión, por ejemplo, al disminuir más los efectos de impedimento estérico y haciendo que el componente FIX y/u otro componente sean más accesibles.

El conector también puede incorporar un resto que puede escindirse químicamente (por ejemplo, hidrólisis de un enlace éster), enzimáticamente (por ejemplo, incorporación de una secuencia de escisión por proteasa) o fotolíticamente (por ejemplo, un cromóforo tal como ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico (ANP)) para liberar la molécula biológicamente activa de la proteína Fc.

La química para reticulación y los reactivos eficaces para dichos propósitos son bien conocidos en la técnica. La naturaleza del reactivo de reticulación usado para conjugar diversos componentes no está restringida por el contenido. Puede usarse cualquier agente de reticulación con la condición de que a) la actividad del FIX se retenga, y b) la unión por el FcRn del componente compañero de unión de FcRn del conjugado no se vea afectado de forma adversa.

Un ejemplo de una reticulación eficaz en una etapa de Fc y un compuesto es la oxidación de Fc con peryodato de sodio en tampón de fosfato de sodio durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de incubación durante una noche a 4 °C con el compuesto a conjugar. La conjugación también puede realizarse al derivatizar tanto el compuesto como los fragmentos Fc con hexanoato de sulfosuccinimidil 6-[3-(2-piridilditio)propionamida (sulfo-LC-SPDP, Pierce) durante 18 horas a temperatura ambiente. Los conjugados también pueden prepararse al derivatizar fragmentos Fc y el compuesto deseado a suministrar con diferentes reactivos de reticulación que posteriormente formarán un enlace covalente. Un ejemplo de esta reacción es la derivatización de fragmentos Fc con ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometilo) (Sulfo-SMCC, Pierce) y el compuesto a conjugar con Fc se tiola con S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA). Los componentes derivatizados se purifican libres de reticulante y se combinan a temperatura ambiente durante una hora para permitir la reticulación. Otros reactivos de reticulación que comprenden grupos funcionales aldehído, imida, ciano, halógeno, carboxilo, carboxilo activado, anhídrido y maleimida

son conocidos por los expertos en la materia y también pueden usarse para la conjugación de compuestos con fragmentos Fc.

La elección de reactivo de reticulación dependerá, por supuesto, de la naturaleza de los componentes deseados a 5 conjuguar. Los reactivos de reticulación descritos anteriormente son eficaces para conjugaciones entre proteínas. Si se tiene que conjuguar un glúcido o resto que contiene glúcido con un polipéptido, entonces reactivos de reticulación heterobifuncionales tales como ABH, M2C2H, MPBH y PDPH son útiles para la conjugación (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Otro método de conjugación de proteínas y glúcidos se divulga por Brumeanu *et al.* (Genetic Engineering News, 1 de octubre de 1995, pág. 16). Si se tiene que conjuguar un lípido o un resto que contiene lípido con un 10 polipéptido, entonces pueden usarse reticulantes tales como SPDP, SMPB y derivados de los mismos (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

En todas las reacciones de reticulación anteriores es importante purificar los compuestos derivatizados libres de 15 reactivo de reticulación. Es importante también purificar el conjugado final sustancialmente libre de reactantes no conjugados. La purificación puede conseguirse por cromatografía de afinidad, filtración en gel o intercambio iónico en función de las propiedades de cualquier componente del conjugado. Un método particularmente preferido es una etapa inicial de purificación por afinidad usando proteína A-Sepharose para retener Fc y conjugados que contienen Fc, seguida de cromatografía de filtración en gel o intercambio iónico en función de la masa, tamaño o carga del conjugado de Fc. La etapa inicial de este esquema de purificación garantiza que el conjugado se unirá a FcRn, que es un requisito 20 esencial del contenido.

Se ha descubierto, de acuerdo con el contenido, que PC5 puede usarse para procesar un polipéptido precursor de 25 FIX para producir un polipéptido de FIX maduro. En una faceta, tanto la PC5 como el polipéptido precursor de FIX se expresan dentro de una célula, donde la PC5 procesa el polipéptido precursor de FIX. En otra faceta, puede usarse una PC5 aislada para procesar un polipéptido precursor de FIX aislado.

Cuando la PC5 y el polipéptido precursor de FIX tienen que coexpresarse dentro de una célula, en una faceta la célula 30 expresa de forma natural PC5 y contiene un vector de expresión que codifica una proproteína de factor IX (proFIX), o una proteína de fusión de la misma.

Cuando la PC5 y el polipéptido precursor de FIX tienen que coexpresarse dentro de una célula, en una faceta la célula 35 contiene un vector de expresión que codifica una proproteína de factor IX (proFIX), o una proteína de fusión de la misma, y la célula se modifica por recombinación homóloga para que incluya una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico que provoca la sobreexpresión de un gen endógeno de PC5. En esta faceta, se intercambia un promotor exógeno más potente en el lugar del promotor de PC5 endógeno, provocando la sobreexpresión de PC5 endógena. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.641.670, 5.733.761 y 5.272.071; WO 91/06666; WO 91/06667; y WO 90/11354.

Cuando la PC5 y el polipéptido precursor de FIX tienen que coexpresarse dentro de una célula, en una faceta la célula 40 contiene un vector de expresión que codifica una proproteína de factor IX (proFIX), o una proteína de fusión de la misma, y un vector de expresión que codifica un polipéptido PC5 funcional. El vector de expresión que codifica una proproteína de factor IX (proFIX), o una proteína de fusión de la misma, y el vector de expresión que codifica un polipéptido PC5 funcional pueden ser vectores de expresión separados o pueden combinarse en un solo vector de expresión.

Como se usa en este documento, un vector de expresión se refiere a cualquier construcción de ácido nucleico que 45 contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de una secuencia codificante insertada, o en el caso de un vector vírico de ARN, los elementos necesarios para la replicación y traducción, cuando se introduce en una célula hospedadora apropiada. Los vectores de expresión pueden incluir plásmidos, fagómidos, virus y derivados de los mismos.

Los vectores de expresión del contenido incluirán un polinucleótido que codifica un polipéptido del contenido, por 50 ejemplo, PC5 y proFIX. Como se usa en este documento, un polinucleótido se refiere a cualquier polímero unido covalentemente de dos o más nucleótidos. Un nucleótido es una molécula compuesta de un glúcido (por ejemplo, ribosa o desoxirribosa) unido a un grupo fosfato y una nucleobase, es decir, una purina o una pirimidina. Las purinas incluyen, aunque sin limitación, adenina y guanina. Las pirimidinas incluyen, aunque sin limitación, citosina, timina y uracilo. En una faceta, un polinucleótido es un polímero de desoxirribonucleótidos, es decir, una molécula de ADN. En una faceta, un polinucleótido es un polímero de ribonucleótidos, es decir, una molécula de ARN. Un polinucleótido, en una faceta, es una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, es decir, el polinucleótido es una secuencia 60 codificante. En una faceta, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido se una molécula de ADN genómico que codifica el polipéptido. En una faceta, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido es una molécula de ADN complementario (ADNc) que codifica el polipéptido. En una faceta, un polinucleótido es una molécula de ADN recombinante que codifica un polipéptido.

En determinadas facetas, una secuencia codificante está unida de forma funcional a una secuencia de control de la 65 expresión. Como se usa en este documento, dos secuencias de ácido nucleico se unen de forma funcional cuando se

unen covalentemente de tal manera que permita que cada secuencia de ácido nucleico componente retenga su funcionalidad. Una secuencia codificante y una secuencia de control de la expresión génica se dice que están unidas de forma funcional cuando se unen covalentemente de tal manera que sitúen la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia codificante bajo la influencia o control de la secuencia de control de la expresión génica.

5 Dos secuencias de ADN se dice que están unidas de forma funcional si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión génica 5' provoca la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza de la unión entre las dos secuencias de ADN (1) no provoca la introducción de una mutación de desplazamiento de la pauta de lectura, (2) no interfiere con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de la secuencia codificante o (3) no interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente de traducirse en una proteína. Por tanto, una

10 secuencia de expresión génica estaría unida de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico codificante si la secuencia de expresión génica pudiera lograr la transcripción de esta secuencia de ácido nucleico codificante de modo que el transcrito resultante se traduzca en la proteína o polipéptido deseado.

Una secuencia de control de la expresión génica, como se usa en este documento, es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia promotora o combinación de promotor-potenciador, que facilita la transcripción y traducción eficaces del ácido nucleico codificante al que está unida de forma funcional. La secuencia de control de la expresión génica puede ser, por ejemplo; un promotor de mamífero o vírico, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores de mamífero constitutivos incluyen, aunque sin limitación, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, promotor de beta-actina, y otros promotores constitutivos. Promotores víricos ejemplares que funcionan constitutivamente en células eucarióticas incluyen, por ejemplo, promotores del citomegalovirus (CMV), virus de simio (por ejemplo, SV40), papilomavirus, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus, y el promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simple. Otros promotores constitutivos son conocidos por los expertos en la

15 materia. Los promotores útiles como secuencias de expresión génica del contenido también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor de la metalotioneína se induce para promover la transcripción y traducción en presencia de determinados iones metálicos. Otros promotores inducibles son conocidos por los expertos en la materia.

En general, la secuencia de control de la expresión génica incluirá, según lo necesario, secuencias que no se transcriben 5' y no se traducen 5' implicadas con el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tal como una secuencia TATA, secuencia de caperuza, secuencia CAAT y similares. Especialmente, dichas secuencias que no se transcriben 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico codificante unido de forma funcional. Las secuencias de expresión génica opcionalmente incluyen

20 secuencias potenciadoras o secuencias activadoras anteriores según se desee.

Los vectores víricos incluyen, aunque sin limitación, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociado; virus del tipo SV40; poliomavirus; virus de Epstein-Barr; papilomavirus; herpesvirus; virus de la variolovacuna; poliovirus; y virus ARN tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no mencionados, pero conocidos en la técnica. Determinados vectores víricos se basan en virus eucarióticos no citopáticos en que se han remplazado genes no esenciales con el gen de interés. Virus no citopáticos incluyen retrovirus, cuyo ciclo vital implica retrotranscripción del ARN vírico genómico en ADN con posterior integración provírica en ADN de la célula hospedadora. Los retrovirus se han aprobado para ensayos de genoterapia en seres humanos. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes en la replicación (es decir, pueden dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero no pueden fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovíricos genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Se proporcionan protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en la replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetado con plásmido, producción de retrovirus recombinantes mediante la línea celular de empaquetado, colección de partículas víricas de medio de histocultivo, e infección de las células diana con partículas víricas) en Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., Nueva York (1990) y Murry, E.J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, Nueva Jersey (1991).

25

30

35

En una faceta, el virus es un virus adenoasociado, un virus de ADN bicatenario. El virus adenoasociado puede manipularse para que sea deficiente en la replicación y pueda infectar una amplia gama de tipos celulares y especies. Además tiene ventajas tales como estabilidad en calor y disolvente lipídico; altas frecuencias de transducción en células de diversas estirpes, incluyendo células hematopoyéticas; y ausencia de inhibición de superinfección permitiendo, por tanto, múltiples series de transducciones. Según se informa, el virus adenoasociado puede integrarse en ADN celular humano de una manera específica de sitio, minimizando de ese modo la posibilidad de mutagénesis por inserción y variabilidad de la expresión del gen insertado característica de infección retrovírica. Además, se han seguido infecciones por virus adenoasociado de tipo silvestre en histocultivo durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de una manera extracromosómica.

40

45

50

55

60

65

- Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han encontrado particularmente ventajosos para suministrar genes a células *in vivo* a causa de su incapacidad de replicarse dentro e integrarse en un genoma hospedador. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado de forma funcional dentro del plásmido. Algunos plásmidos usados normalmente disponibles de proveedores comerciales incluyen pBR322, pUC18, pUC19, diversos plásmidos pcDNA, pRC/CMV, diversos plásmidos pCMV, pSV40 y pBlueScript. Ejemplos adicionales de plásmidos específicos incluyen pcDNA3.1, número de catálogo V79020; pcDNA3.1/hygro, número de catálogo V87020; pcDNA4/myc-His, número de catálogo V86320; y pBudCE4. 1, número de catálogo V53220, todos de Invitrogen (Carlsbad, CA). Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, pueden diseñarse plásmidos de forma personalizada usando técnicas convencionales de biología molecular para retirar y/o añadir fragmentos específicos de ADN.
- En un sistema de expresión de insecto que puede usarse para producir las proteínas del contenido, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar los genes exógenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Una secuencia codificante puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedro) del virus y situarse bajo el control de un promotor de ACNPV (por ejemplo, el promotor de poliedro). La inserción satisfactoria de una secuencia codificante provocará la inactivación del gen de poliedro y la producción de virus recombinante no ocluido (es decir, virus que carece de la cubierta proteínica codificada por el gen de poliedro). Estos virus recombinantes se usan entonces para infectar células *Spodoptera frugiperda* en que se expresa el gen insertado. (Véase, por ejemplo, Smith *et al.* (1983) J Virol 46:584; patente de Estados Unidos n.º 4.215.051). Pueden encontrarse ejemplos adicionales de este sistema de expresión en Ausubel *et al.*, eds. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.
- Otro sistema que puede usarse para expresar las proteínas del contenido es el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa, también denominado "sistema de expresión de GS" (Lonza Biologics PLC, Berkshire Reino Unido). Este sistema de expresión se describe con detalle en la patente de Estados Unidos n.º 5.981.216.
- En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos donde se usa un adenovirus como vector de expresión, puede ligarse una secuencia codificante a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico después puede insertarse en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y con capacidad de expresar el péptido en hospedadores infectados. (Véase, por ejemplo, Logan y Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:3655). Como alternativa, puede usarse el promotor de 7,5 K de la variolovacuna. Véase, por ejemplo, Mackett *et al.* (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:7415; Mackett *et al.* (1984) J Virol 49:857; Panicali *et al.* (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:4927.
- Para aumentar la eficacia de producción, los polinucleótidos pueden diseñarse para que codifiquen múltiples unidades de la proteína del contenido separadas por sitios de escisión enzimática. El polipéptido resultante puede escindirise (por ejemplo, por tratamiento con la enzima apropiada) para recuperar las unidades polipeptídicas. Esto puede aumentar la producción de polipéptidos dirigidos por un solo promotor. Cuando se usan en sistemas de expresión víricos apropiados, la traducción de cada polipéptido codificado por el ARNm se dirige internamente en el transcrito; por ejemplo, por un sitio interno de entrada del ribosoma, IRES. Por tanto, la construcción policistrónica dirige la transcripción de un solo ARNm policistrónico grande que, a su vez, dirige la traducción de múltiples polipéptidos individuales. Esta estrategia elimina la producción y procesamiento enzimático de poliproteínas y puede aumentar significativamente el rendimiento del polipéptido dirigido por un solo promotor.
- Los vectores usados en transformación habitualmente contendrán un marcador de selección usado para identificar transformantes. En sistemas bacterianos, esto puede incluir un gen de resistencia a antibiótico tal como ampicilina o kanamicina. Marcadores de selección para su uso en células de mamífero cultivadas incluyen genes que confieren resistencia a fármacos, tal como neomicina, higromicina y metotrexato. El marcador de selección puede ser un marcador de selección amplificable. Un marcador de selección amplificable es el gen del dihidrofolato reductasa (DHFR). Simonsen CC *et al.* (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:2495-9. Los marcadores de selección se revisan por Thilly (1986) Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass., y la elección de marcadores de selección pertenece al nivel de habilidades habituales en la técnica.
- Pueden introducirse marcadores de selección en la célula en un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o pueden introducirse en el mismo plásmido. Si están en el mismo plásmido, el marcador de selección y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, produciendo la última disposición un mensaje dicistrónico. Las construcciones de este tipo son conocidas en la técnica (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.713.339).
- Los vectores de expresión pueden codificar marcas que permitan fácil purificación de la proteína producida de forma recombinante. Ejemplos incluyen, aunque sin limitación, vector pUR278 (Ruther *et al.*, (1983) EMBO J 2:1791) en que

las secuencias codificantes de la proteína a expresar pueden ligarse en el vector en el mismo marco de lectura con la región codificante de lac z de modo que se produzca una proteína de fusión marcada; pueden usarse vectores pGEX para expresar proteínas del contenido con una marca de glutatión S-transferasa (GST). Estas proteínas habitualmente son solubles y pueden purificarse fácilmente de células por adsorción a microesferas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores incluyen sitios de escisión (trombina o proteasa factor Xa o PreScission Protease™ (Pharmacia, Peapack, N.J.)) para una fácil eliminación de la marca después de la purificación.

El vector o vectores de expresión entonces se transfectan o cotransfectan en una célula diana adecuada, que expresará los polipéptidos. Técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, aunque sin limitación, precipitación con fosfato de calcio (Wigler *et al.* (1978) Cell 14:725), electroporación (Neumann *et al.* (1982) EMBO J 1:841), y reactivos basados en liposomas. Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector de expresión para expresar las proteínas descritas en este documento incluyendo células tanto procarióticas o eucarióticas. Estos incluyen, aunque sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante o ADN plasmídico que contienen una secuencia codificante apropiada; levaduras u hongos filamentosos transformados con vectores de expresión recombinantes de levadura u hongos que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen una secuencia codificante apropiada; o sistemas de células animales, incluyendo células de mamífero (por ejemplo, células HEK 293, CHO, Cos, HeLa y BHK).

En una faceta, la célula hospedadora es una célula eucariótica. Como se usa en este documento, una célula eucariótica se refiere a cualquier célula animal o vegetal que tenga un núcleo definido. Células eucarióticas de animales incluyen células de vertebrados, por ejemplo, mamíferos, y células de invertebrados, por ejemplo, insectos. Células eucarióticas de plantas específicamente pueden incluir, sin limitación, células de levadura. Una célula eucariótica es distinta de una célula procariótica, por ejemplo, bacterias.

En determinadas facetas, la célula eucariótica es una célula de mamífero. Una célula de mamífero es cualquier célula derivada de un mamífero. Las células de mamífero específicamente incluyen, aunque sin limitación, líneas celulares de mamífero. En una faceta, la célula de mamífero es una célula humana. En una faceta, la célula de mamífero es una célula HEK 293, que es una línea celular de riñón embrionario humano. Las células HEK 293 están disponibles como CRL-1533 de la American Type Culture Collection, Manassas, VA, y como células 293-H, n.º de catálogo 11631-017 o células 293-F, n.º de catálogo 11625-019 de Invitrogen (Carlsbad, CA.). En una faceta, la célula de mamífero es una célula PER.C6®, que es una línea celular humana derivada de retina. Las células PER.C6® están disponibles de Crucell (Leiden, Países Bajos). En una faceta, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO están disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, VA (por ejemplo, CHO-K1; CCL-61). En una faceta, la célula de mamífero es una célula de riñón de cría de hámster (BHK). Las células BHK están disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, VA (por ejemplo, CRL-1632).

En una faceta, un plásmido que incluye una secuencia codificante de fusión de proFIX-Fc y un marcador de selección, por ejemplo, resistencia a zeocina, se transfecta en células HEK 293, para la producción de homodímero de FIX-Fc.

En una faceta, un primer plásmido que incluye una secuencia codificante de fusión de proFIX-Fc y un primer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a zeocina, y un segundo plásmido que incluye una secuencia codificante de Fc y un segundo marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, se cotransfectan en células HEK 293, para la producción de híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc. El primer y segundo plásmido pueden introducirse en cantidades iguales (es decir, relación 1:1), o pueden introducirse en cantidades desiguales.

En una faceta, un primer plásmido que incluye una secuencia codificante de fusión de proFIX-Fc y un primer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a zeocina, y un segundo plásmido que incluye una secuencia codificante de Fc y un segundo marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, y un tercer plásmido que incluye una secuencia codificante de PC5 y un tercer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a higromicina, se cotransfectan en células HEK 293, para la producción de híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc. El primer y segundo plásmido pueden introducirse en cantidades iguales (es decir, relación molar 1:1), o pueden introducirse en cantidades desiguales.

En una faceta, un primer plásmido, que incluye una secuencia codificante de fusión de proFIX-Fc, una secuencia codificante de Fc y un primer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a zeocina, y un segundo plásmido que incluye una secuencia codificante de PC5 y un segundo marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a higromicina, se cotransfectan en células HEK 293, para la producción de híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc. Los promotores para la secuencia codificante de fusión de proFIX-Fc y la secuencia codificante de Fc pueden ser diferentes o pueden ser iguales.

En una faceta, un primer plásmido que incluye una secuencia codificante de fusión de proFIX-Fc, una secuencia codificante de Fc y un primer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a zeocina, y un segundo plásmido que incluye una secuencia codificante de Fc y un segundo marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, y un tercer plásmido que incluye una secuencia codificante de PC5 y un tercer marcador de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a higromicina, se cotransfectan en células HEK 293, para la producción de híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc. Los promotores para la secuencia codificante de fusión de proFIX-Fc y la secuencia codificante de Fc en el primer plásmido pueden ser diferente o pueden ser iguales. El primer y segundo plásmido pueden introducirse en cantidades iguales (es decir, relación molar 1: 1), o pueden introducirse en cantidades desiguales.

En una faceta, se incluye una forma troncada del intrón I de FIX (n.º de acceso a GenBank NC_000023) dentro de la secuencia codificante de FIX. Esto ha demostrado previamente aumentar el nivel de expresión de FIX debido a las secuencias de empalme funcionales presentes en el ARNm precursor. Kurachi S *et al.* (1995) J Biol Chem. 270:5276-81.

En una faceta, las células transfectadas se transfectan de forma estable. Estas células pueden seleccionarse y mantenerse como una línea celular estable, usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

Las células hospedadoras que contienen construcciones de ADN de la proteína se cultivan en un medio de cultivo apropiado. Como se usa en este documento, la expresión "medio de cultivo apropiado" significa un medio que contiene nutrientes requeridos para el crecimiento de las células. Los nutrientes requeridos para el crecimiento de las células pueden incluir una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. Opcionalmente, el medio puede contener uno o más factores de selección. Opcionalmente, el medio puede contener suero bovino de ternero o suero fetal de ternero (FCS). En una faceta, el medio no contiene sustancialmente IgG. El medio de cultivo en general seleccionará células que contienen la construcción de ADN por, por ejemplo, selección con fármaco o deficiencia en un nutriente esencial que se complementa mediante el marcador de selección en la construcción de ADN o se cotransfecta con la construcción de ADN. Las células de mamífero cultivadas en general se cultivan en medios que contienen suero o sin suero disponibles en el mercado (por ejemplo, MEM, DMEM, DMEM/F12). En una faceta, el medio es CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA). En una faceta, el medio es CD17 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La selección de un medio apropiado para la línea celular particular usada pertenece al nivel de las habilidades habituales en la técnica.

En un aspecto, el contenido proporciona un método para producir un polipéptido que contiene factor IX maduro a partir de una proproteína de factor IX, o una proteína de fusión de la misma.

Como se usa en este documento, un polipéptido que contiene factor IX maduro se refiere a un polipéptido que incluye una forma madura de factor IX. En una faceta, un polipéptido que contiene factor IX maduro se refiere a un polipéptido que es una forma madura de factor IX. Una forma madura de factor IX incluye al menos un dominio Gla γ -carboxilado y un dominio catalítico, y excluye tanto un prepéptido como un propéptido, como se describe en este documento. La forma madura de factor IX puede ser, pero no necesariamente, una forma activada de factor IX. Por ejemplo, en una faceta, una forma madura de factor IX está representada por los residuos aminoacídicos 47-461 de SEQ ID NO:3. En una faceta, al menos diez de los doce residuos de ácido glutámico en el dominio Gla están gamma carboxilados. Cuando solamente diez de los doce residuos de ácido glutámico en el dominio Gla están gamma carboxilados, en una faceta, los diez residuos glutámicos carboxilados son los primeros diez residuos de ácido glutámico en el dominio Gla (por ejemplo, Glu53, Glu54, Glu61, Glu63, Glu66, Glu67, Glu72, Glu73, Glu76 y Glu79 en SEQ ID NO:3). En una faceta, al menos once de los doce residuos de ácido glutámico en el dominio Gla están gamma carboxilados. En una faceta, todos los residuos de ácido glutámico en el dominio Gla están gamma carboxilados.

En una faceta de acuerdo con este aspecto del contenido, un polipéptido que contiene factor IX maduro se refiere a un polipéptido que es una forma madura de factor IX.

En una faceta de acuerdo con este aspecto del contenido, el polipéptido que contiene factor IX maduro es un híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc, tal como se divulga en la solicitud de patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente n.º 10/841250, publicada como US 2005/0032174. En esta faceta, la proteína de fusión de proproteína corresponde a un híbrido de monómero-dímero de proFIX-Fc.

También se proporciona un híbrido de monómero-híbrido de FIX maduro-Fc producido de acuerdo con el método de este aspecto del contenido.

El método para producir polipéptido que contiene factor IX maduro implica cultivar células que contienen un primer vector de expresión que codifica una proproteína de factor IX, o una proteína de fusión de la misma, y un segundo vector de expresión que codifica un polipéptido PC5 funcional, como se describe anteriormente. Las células se cultivan en condiciones que permiten la expresión tanto de la proFIX o la proteína de fusión de la misma como del polipéptido PC5 funcional.

Como se usa en este documento, cultivar se refiere a mantener células vivas *in vitro* durante al menos un tiempo definido. El mantenimiento puede incluir, pero no necesariamente, un aumento en la población de células vivas. Por ejemplo, las células mantenidas en cultivo pueden ser de población estática, pero aún viables y con capacidad de producir un producto deseado, por ejemplo, una proteína recombinante o proteína de fusión recombinante. Las condiciones adecuadas para cultivar células eucarióticas son bien conocidas en la técnica e incluyen selección apropiada de medio de cultivo, complementos del medio, temperatura, pH, saturación de oxígeno y similares. Para propósitos comerciales, el cultivo puede incluir el uso de cualquiera de diversos tipos de sistemas que se pueden aumentar de escala incluyendo matraces de agitación, frascos rodantes, biorreactores de fibra hueca, biorreactores de depósito agitado, biorreactores suspendidos, biorreactores de ondas y otros.

Las condiciones de cultivo celular también se seleccionan para permitir el procesamiento de la proFIX o proteína de fusión de la misma por el polipéptido PC5 funcional. Las condiciones que permiten el procesamiento de la proFIX o proteína de fusión de la misma por el polipéptido PC5 funcional pueden incluir específicamente la presencia de una fuente de vitamina K. Por ejemplo, en una faceta, células HEK 293 transfectadas de forma estable se cultivan en medio CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con glutamina 4 mM y 10 µg/l de vitamina K₃.

Como se usa en este documento, procesamiento por PC5 funcional se refiere a escisión del propéptido de proFIX. En otras palabras, el procesamiento por PC5 funcional se refiere a la conversión mediada por PC5 de un polipéptido que contiene proFIX en un polipéptido que contiene factor IX maduro.

El contenido, en un aspecto, se refiere a un método para aumentar el rendimiento de un polipéptido que contiene factor IX maduro a partir de una proproteína de factor IX, o una proteína de fusión de la misma. Como se usa en este documento con respecto al polipéptido que contiene factor IX maduro, aumentar el rendimiento se refiere a inducir un aumento medible en la cantidad o actividad de un polipéptido que contiene factor IX maduro, obtenido con PC5 y en condiciones especificadas, en comparación con una cantidad o actividad de referencia del polipéptido que contiene factor IX maduro, obtenido sin PC5 y en las condiciones especificadas. En una faceta, el aumento medible es al menos un 5 por ciento. En una faceta, el aumento medible es al menos un 10 por ciento. En facetas individuales adicionales, el aumento medible es al menos un 20 por ciento, al menos un 30 por ciento, al menos un 40 por ciento, al menos un 50 por ciento, al menos un 60 por ciento, al menos un 70 por ciento, al menos un 80 por ciento, al menos un 90 por ciento o al menos un 100 por ciento.

El contenido, en un aspecto, se refiere a un método para producir un polipéptido que contiene factor IX maduro a partir de una proproteína de factor IX, o una proteína de fusión de la misma. Como se usa en este documento, producir un polipéptido que contiene factor IX maduro a partir de una proproteína de factor IX, o un conjugado de la misma, se refiere a procesar la proFIX o el conjugado de la misma con PC5 para producir un polipéptido que contiene factor IX maduro.

Como se usa en este documento, un conjugado se refiere a dos o más entidades cualesquiera unidas entre sí por cualquier medio fisicoquímico incluyendo, aunque sin limitación, interacción hidrófoba, interacción covalente, interacción de enlaces de hidrógeno, interacción iónica y cualquier combinación de las mismas. Por tanto, en una faceta, un conjugado del contenido se refiere a dos o más entidades cualesquiera unidas entre sí por interacción covalente. Por ejemplo, en una faceta, un conjugado es una proteína de fusión. En una faceta, un conjugado del contenido se refiere a dos o más entidades cualesquiera unidas entre sí por interacción no covalente.

El método de acuerdo con este aspecto del contenido implica poner en contacto la proFIX o el conjugado de la misma con una cantidad eficaz de polipéptido PC5 funcional. Poner en contacto se refiere a llevar las diversas entidades a un contacto físico íntimo, por ejemplo, para permitir que PC5 procese la proFIX o el conjugado de la misma. Una cantidad eficaz, como se usa en este documento, se refiere a una cantidad que es suficiente para conseguir un efecto biológico deseado, por ejemplo, procesamiento de la proFIX o el conjugado de la misma por PC5.

En una faceta, el método de acuerdo con este aspecto del contenido puede ponerse en práctica usando una proproteína de factor IX aislada, o un conjugado de la misma, y un polipéptido PC5 aislado. Por ejemplo, una proproteína de factor IX aislada derivada de una fuente puede ponerse en contacto con un polipéptido PC5 aislado derivado de otra fuente, en condiciones que permitan el procesamiento de la proFIX o proteína de fusión de la misma por el polipéptido PC5 funcional. Las condiciones que permiten el procesamiento de la proFIX o proteína de fusión de la misma por el polipéptido PC5 funcional incluyen la presencia de una fuente de vitamina K, gamma carboxilasa y componentes adicionales y condiciones adecuadas para la actividad enzimática gamma carboxilasa.

En una faceta de acuerdo con este aspecto del contenido, el polipéptido que contiene factor IX maduro es un híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc, tal como se divulga en la solicitud de patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente n.º 10/841250, publicada como US 2005/0032174. En esta faceta, el conjugado de proFIX corresponde a un híbrido de monómero-dímero de proFIX-Fc.

También se proporciona un híbrido de monómero-híbrido de FIX maduro-Fc producido de acuerdo con el método de este aspecto del contenido.

Como se usa en este documento, proFIX PEGilada se refiere a un conjugado formado entre proFIX y al menos una molécula de polietilenglicol (PEG). El PEG está disponible en el mercado en una gran diversidad de pesos moleculares e intervalos de peso molecular promedio. Ejemplos típicos de intervalos de peso molecular promedio de PEG incluyen, aunque sin limitación, 200, 300, 400, 600, 1000, 1300-1600, 1450, 2000, 3000, 3000-3750, 3350, 3000-7000, 3500-4500, 5000-7000, 7000-9000, 8000, 10 000, 8500-11 500, 16 000-24 000, 35 000 y 40 000. Estos pesos moleculares promedio se proporcionan simplemente como ejemplos y no se pretende que sean limitantes de ninguna manera.

En una faceta, el péptido del contenido puede PEGilarse para que incluya restos de mono- o poli- (por ejemplo, 2-4) PEG. La PEGilación puede realizarse por cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica. Los métodos para preparar un producto proteínico PEGilado en general incluirán (a) hacer reaccionar un polipéptido con polietilenglicol (tal como un éster reactivo o derivado aldehídico de PEG) en condiciones por las que el péptido del contenido queda fijado a uno o más grupos de PEG; y (b) obtener el uno o más productos de reacción. En general, las condiciones óptimas de reacción para las reacciones se determinarán caso a caso en función de los parámetros conocidos y el resultado deseado.

Hay varios métodos de fijación de PEG disponibles para los expertos en la materia, por ejemplo, documento EP 0 401 384; Malik F *et al.* (1992) *Exp Hematol.* 20:1028-35; Francis (1992) *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10; documentos EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; y WO 95/34326.

La etapa de PEGilación como se describe para las proteínas del contenido puede realizarse mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula reactiva de polietilenglicol. Por tanto, los productos proteínicos de acuerdo con el presente contenido incluyen proteínas PEGiladas en donde el uno o más grupos de PEG se fijan mediante grupos acilo o alquilo. Dichos productos pueden estar mono-PEGilados o poli-PEGilados (por ejemplo, los que contienen 2-6 o 2-5 grupos de PEG). Los grupos de PEG en general se fijan a la proteína en los grupos α - o ϵ -amino de los aminoácidos, pero también se contempla que los grupos de PEG puedan fijarse a cualquier grupo amino fijado a la proteína que sea suficientemente reactivo para quedar fijado a un grupo de PEG en condiciones adecuadas de reacción.

La PEGilación por acilación en general implica hacer reaccionar un derivado de éster activo de polietilenglicol con un péptido del contenido. Para reacciones de acilación, el uno o más polímeros seleccionados típicamente tienen un solo grupo éster reactivo. Puede usarse cualquier molécula de PEG reactiva conocida o a descubrir posteriormente para realizar la reacción de PEGilación. Un ejemplo de un éster de PEG activado adecuado es PEG esterificado con N-hidroxisuccinimida (NHS). Como se usa en este documento, se contempla que la acilación incluye, sin limitación, los siguientes tipos de enlaces entre la proteína terapéutica y un polímero tal como PEG: amida, carbamato, uretano y similares. Véase, por ejemplo, Chamow SM *et al.* (1994) *Bioconjug Chem.* 5:133-40. Las condiciones de reacción pueden seleccionarse de cualquiera de las conocidas en la técnica de PEGilación o a desarrollar posteriormente, pero deben evitar condiciones tales como temperatura, disolvente y pH que inactivarían el polipéptido a modificar.

La PEGilación por acilación en general produce una proteína poli-PEGilada. El enlace de conexión puede ser una amida. El producto resultante puede estar sustancialmente solo (por ejemplo, >95 %) mono-, di- o tri-PEGilado. Sin embargo, pueden formarse algunas especies con mayores grados de PEGilación en cantidades que dependen de las condiciones específicas de reacción usadas. Si se desea, pueden separarse de la mezcla especies PEGiladas más purificadas (particularmente especies sin reaccionar) por técnicas convencionales de purificación incluyendo, entre otras, diálisis, desalado, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y electroforesis.

La PEGilación por alquilación en general implica hacer reaccionar un derivado de aldehído terminal de PEG con un polipéptido en presencia de un agente reductor. Para la reacción de alquilación reductora, el o los polímeros seleccionados deben tener un solo grupo aldehído reactivo. Un aldehído de PEG reactivo ejemplar es propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o derivados de mono alcoxi o ariloxi C1-C10 del mismo. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.252.714.

El FIX producido de forma recombinante puede aislarse de células, medios de cultivo y otros productos, para su uso *in vitro* e *in vivo*, incluyendo uso clínico.

Cuando las proteínas se producen de acuerdo con los métodos del contenido, pueden producirse en una mezcla de moléculas tales como otras proteínas o fragmentos de proteína. Por ejemplo, los híbridos de monómero-dímero de FIX-Fc en general se expresan en una mezcla de productos que también incluyen dímeros de FIX-Fc y dímeros de Fc. El contenido, por tanto, puede implicar métodos de aislamiento de cualquiera de las proteínas descritas *supra* de una mezcla que contiene las proteínas. En particular, en una faceta, el contenido puede implicar métodos para aislar un híbrido de monómero-dímero de proFIX-Fc de una mezcla de proteínas que incluye el híbrido de monómero-dímero, un dímero y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fc. En una faceta, el contenido puede implicar métodos para aislar un homodímero de proFIX-Fc de una mezcla de proteínas que incluye el híbrido de monómero-dímero, un dímero y al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un Fc.

En una faceta, el producto proteínico se secreta al medio. El medio se separa de las células, se concentra, se filtra y después se pasa sobre dos o tres columnas de afinidad: una columna de proteína A y una o dos columnas de intercambio aniónico.

5 En un ejemplo típico, las células se separan del medio por centrifugación en frascos desechables. El medio separado entonces se filtra a través de filtros PALL AcroPak de 0,8/0,2 μm , y se concentra 5-7 veces con un sistema de filtración de flujo tangencial Millipore ProFlux M12, casetes Pellicon 2, 10 K, B10-A, 0,5 m^2 . El retenido se filtra usando filtro PALL AcroPak de 0,8/0,2 μm en bolsas de plástico estériles.

10 La columna de proteína A (MabSelect, Amersham) se equilibra con PBS, pH 7,4. La columna se carga con 10-15 mg de proteína/ml de resina a un caudal de 150-200 cm/hora y se lava con PBS seguido de 3-5 volúmenes de columna de PBS más NaCl 0,9 M. Antes de la elución, se reduce la conductividad con PBS. La columna entonces se eluye con citrato de sodio 25 mM/NaCl 150 mM, pH 3,4, y las fracciones se neutralizan con Tris 2 M hasta un pH final de 7. El eluido resultante contiene todas las especies que contienen Fc.

15 El eluido de la columna de proteína A se carga en una columna de DEAE (Fractogel, EMD) y la columna se equilibra con Tris 25 mM/NaCl 150 mM, pH 7,5. Después de lavar la columna cargada y equilibrada con 3-5 volúmenes de columna de Tris 25 mM/acetato de amonio 350 mM, pH 7,5, la columna se eluye con Tris 25 mM/acetato de amonio 600 mM, pH 7,5. El eluido contiene híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc, libre de dímero de FIX-Fc y fragmentos Fc.

20 Aunque la pureza del híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc ya es de aproximadamente un 98 por ciento después de cromatografía en DEAE, como una etapa adicional para enriquecer la actividad coagulante del híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc aislado, puede usarse una segunda etapa de cromatografía de intercambio iónico. El eluido de la etapa previa se diluye 1:4 con Tris 25 mM/NaCl 150 mM, pH 7,5, y se carga en una columna de Q Sepharose FF (Amersham) a 7-10 mg/ml. Después de lavar la columna con tampón de equilibrado, la columna se eluye con CaCl_2 7 mM/NaCl 150 mM/Tris 25 mM, pH 7,5. El híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc eluido se recoge hasta que la señal de UV cae hasta aproximadamente un 20 por ciento de la absorbancia máxima a 280 nm. El híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc menos activo puede separarse de la columna con mayor concentración de CaCl₂ (por ejemplo, 10 mM) o acetato de amonio (por ejemplo, 600 mM). Se conocen en el campo métodos alternativos y adicionales de purificación y enriquecimiento, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.981.952 y 5.714.583.

25 Usando cartografiado de péptidos, es posible mostrar que el propéptido está completamente procesado del híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc por PC5. La digestión tripsinica (LysC, ArgC) del híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc genera un marcador para el propéptido (péptido indicado de propéptido, "PIP") si el propéptido de FIX no se procesa completamente. El propéptido de FIX tiene una secuencia de aminoácidos TVFLDHENANKII,NRPKR (SEQ ID NO: 17), cuya secuencia TVFLDHENANK (SEQ ID NO: 18) representa el péptido indicador de propéptido (PIP). El PIP está presente en híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc transfectado sin enzima de procesamiento (PC5), y está ausente en híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc transfectado con enzima de procesamiento (PC5). PIP también está presente en híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc transfectado con PC7, y ausente en FIX en solitario transfectado con PACE. En contraste, un péptido de referencia ("K23" correspondiente a los residuos aminoacídicos 395-400 de SEQ ID NO:3), que tiene la secuencia YGIYTK (SEQ ID NO: 19), está presente en híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc transfectado con o sin enzima de procesamiento (PC5).

35 La actividad de FIX activado maduro y polipéptidos que contienen FIX del contenido puede medirse usando un ensayo convencional de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Este ensayo se usa ampliamente como ensayo clínico para la actividad de coagulación del factor IX. Para realizar el ensayo, se preincuba una muestra de ensayo en plasma deficiente en FIX con fosfolípidos y un activador tal como ácido elálgico o sílice, y después se induce la formación de coágulo mediante la adición de CaCl_2 . Se mide el tiempo hasta la formación de coágulo, por ejemplo, con un instrumento clínico MLA Electra 1600, y se compara con un patrón de factor IX del la Organización Mundial de la Salud (OMS).

40 Una ventaja particular de proteínas de fusión y conjugados de FIX-Fc sobre FIX en solitario es una semivida prolongada *in vivo*. La semivida prolongada permite una necesidad de dosificación radicalmente reducida en comparación con FIX en solitario. Por ejemplo, en un experimento, se encontró que híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc derivado de HEK 293 tenía una semivida terminal de 30,0 horas después de inyección intravenosa en ratas normales. Por comparación, se encontró que la semivida terminal de BeneFIX[®] era de 5 horas después de inyección intravenosa en ratas normales. En un conjunto separado de experimentos en perros normales, se encontró que las semividas terminales de híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc y BeneFIX[®] eran de 36 horas y 12-14 horas, respectivamente, después de administración intravenosa. Sorprendentemente, se encontró que la semivida de dímero de FIX-Fc en este conjunto de experimentos en perros era de 22 horas. En todos estos experimentos, se realizaron mediciones farmacocinéticas usando ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA) específicos para FIX.

45 Además de los resultados basados en ELISA que muestran semivida *in vivo* prolongada de híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc, también se demostró que la actividad funcional de híbrido de monómero-dímero de FIX-Fc ser prolongaba al medir el aPTT en ratones deficientes de FIX. Después de una sola dosis intravenosa de híbrido de

monómero-dímero de FIX-Fc (217 IU/kg de peso corporal), la actividad aPTT en plasma demostró descender con una semivida de 47 horas en ratones deficientes de FIX.

5 El contenido se refiere, en parte, a un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno hemostático, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un polipéptido FIX producido de acuerdo con uno o más métodos del contenido. En particular, las proteínas de fusión y conjugados del contenido pueden usarse para tratar o prevenir un trastorno hemostático asociado con la deficiencia de FIX, al promover la formación de un coágulo de fibrina. Un trastorno hemostático que puede tratarse por la administración de la proteína de fusión o conjugado del contenido incluye, aunque sin limitación, hemofilia B.

10 Una proteína FIX o conjugado del contenido puede usarse profilácticamente para tratar a un sujeto con un trastorno hemostático. Como alternativa o adicionalmente, una proteína de fusión o conjugado de FIX del contenido puede usarse para tratar un episodio hemorrágico agudo en un sujeto con un trastorno hemostático. En una faceta, el trastorno hemostático es el resultado de una deficiencia hereditaria en el factor IX. En otra faceta, el trastorno hemostático puede ser un trastorno adquirido. El trastorno adquirido puede ser el resultado de una enfermedad o afección secundaria subyacente. La enfermedad o afección secundaria puede ser, por ejemplo y sin limitación, hepatopatía, coagulación intravascular diseminada (DIC), septicemia o infección, un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, embarazo, edad avanzada o por medicación para tratar un trastorno secundario subyacente (por ejemplo, quimioterapia para el cáncer).

15 Las proteínas FIX y conjugados de FIX del contenido pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada de administración, incluyendo intravenosa, subcutánea, intramuscular, o mediante cualquier superficie mucosa, por ejemplo, oral, sublingual, bucal, nasal, rectal, vaginal o mediante vía pulmonar. Las proteínas FIX y conjugados del contenido opcionalmente pueden implantarse dentro de o ligarse a un soporte sólido biopolimérico que permita la liberación lenta de la proteína FIX o conjugado al sitio deseado.

20 Las proteínas de fusión de FIX-compañero de unión de FcRn y otros conjugados que contienen compañero de unión de FcRn, en particular son muy adecuados para administración a cualquier superficie epitelial que exprese FcRn. Dichas superficies epiteliales incluyen, aunque sin limitación, oral, gástrica, intestinal, intrabiliar, intranasal y pulmonar, incluyendo en particular las vías respiratorias grandes.

25 La dosis de la proteína FIX o conjugado del contenido variará dependiendo del sujeto y de la vía particular de administración usada. Las dosificaciones pueden variar de 0,1 a 100 000 µg/kg de peso corporal. En una faceta, el intervalo de dosificación es 0,1-2000 µg/kg. La proteína o conjugado puede administrarse de forma continua o a intervalos de tiempo específicos. Pueden emplearse ensayos *in vitro* para determinar intervalos y/o pautas óptimas de dosis para administración. Además, las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta obtenidas de modelos animales.

30 Para uso clínico, las proteínas FIX y conjugados del contenido pueden formularse con cualquier vehículo farmacéutico adecuado. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin. Ejemplos de excipientes pueden incluir almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición también puede contener reactivos tamponantes del pH, y agentes humectantes o emulsionantes.

35 Para administración oral, la composición farmacéutica puede adoptar la forma de comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales. La composición también puede prepararse como un líquido, por ejemplo, un jarabe o una suspensión. El líquido puede incluir agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (lecitina o goma arábica), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados) y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones opcionalmente también pueden incluir agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes. Como alternativa, la composición puede presentarse como un producto seco (por ejemplo, liofilizada) para su constitución con agua u otro vehículo adecuado.

40 Para administración bucal y sublingual, la composición puede adoptar la forma de comprimidos, pastillas o películas de disolución rápida de acuerdo con protocolos convencionales.

45 Para la administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con el presente contenido se administran convenientemente en forma de un pulverizador de aerosol desde un envase presurizado o nebulizador (por ejemplo, en PBS), con un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica puede formularse para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa o intramuscular) por inyección rápida o infusión. Las formulaciones para inyección o infusión pueden presentarse en forma monodosis, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo (por ejemplo, liofilizado) para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena.

La composición farmacéutica también puede formularse para administración rectal como un supositorio o enema de retención, por ejemplo, que contiene bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

La proteína FIX o conjugado del contenido puede usarse para tratar a un sujeto con una enfermedad o afección hemostática en combinación con al menos otro agente conocido para tratar dicha enfermedad o afección. En una faceta, el contenido se refiere a un método de tratamiento de un sujeto con un trastorno hemostático, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una proteína FIX o conjugado del contenido, en combinación con una fuente de al menos otro factor de coagulación o agente que promueve la hemostasia. Dicha fuente, en una faceta, es una preparación de plasma, por ejemplo, plasma congelado reciente. Dicho otro factor de coagulación o agente que promueve la hemostasia puede ser cualquier agente terapéutico con actividad coagulante demostrada. Como ejemplo, pero no como limitación, el factor de coagulación o agente hemostático puede incluir factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, protrombina, fibrinógeno o formas activadas de cualquiera de los precedentes. El factor de coagulación del agente hemostático también puede incluir fármacos antifibrinolíticos, por ejemplo, ácido épsilon-aminocaproico, ácido tranexámico.

El presente contenido se ilustra además por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación de construcciones que expresan Fc

La secuencia codificante de la región constante de IgG1 (EU n.º 221-447; la región Fc) se obtuvo por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de una colección de ADNc de leucocitos (Clontech, CA) usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

rcFc-F: 5'- GCTGCGGTCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCTCC-
GGAACTCCTGGGCGGACCGTCAGTC -3' (SEQ ID NO:20)

rcFc-R: 5'- ATTGGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC -3' (SEQ ID NO:21)

El cebador directo rcFc-F añade tres aminoácidos (AAV) y un sitio de clonación Sall antes del inicio de la región Fc, y también incorpora un sitio de restricción BspEI en los aminoácidos 231-233 y un sitio de restricción RsrII en los aminoácidos 236-238 usando la degeneración del código genético para conservar la secuencia de aminoácidos correcta (numeración EU). El cebador inverso rcFc-R añade un sitio de clonación EcoR1 después del codón de parada de Fc. Se realizó una reacción de PCR de 25 µl con 25 pmol de cada cebador usando el sistema de alta fidelidad Expand™ (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante en un termociclador MJ usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos); 72 °C 10 minutos. La banda de tamaño esperado (~696 pb) se purificó del gel con un kit de extracción de gel (Qiagen, Valencia, CA), y se clonó en pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) para producir un plásmido intermedio pSYN-Fc-001 (pGEM T-Easy/Fc).

La secuencia señal de Igk de ratón se añadió a la CDS de Fc usando los siguientes cebadores:

rc-Igk sig seq-F: 5'-TTTAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCC-
TGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACAAAAC-
CACACATGCCACCG -3' (SEQ ID NO:22)

Fc-noXma-GS-R: 5'- GGTCAGCTCATCGCGGGATGGG -3' (SEQ ID NO:23)

Fc-noXma-GS-F: 5'- CCCATCCCGCGATGAGCTGACC -3' (SEQ ID NO:24)

El cebador rc-secuencia señal de Igk-F (rc-Igk sig seq-F) añade un sitio de restricción HindIII al extremo 5' de la molécula, seguido de una secuencia Kozak (GCCGCCACC; SEQ ID NO:25) seguida de la secuencia señal de la cadena ligera de Igx de ratón, directamente colindante al inicio de la secuencia de Fc (EU n.º 221). Los cebadores Fc-noXma-GS-F y Fc-noXma-GS-R eliminan el sitio XmaI interno de la secuencia codificante de Fc, usando la degeneración del código genético para conservar la secuencia de aminoácidos correcta. Se realizaron dos reacciones de PCR de 25 µl con 25 pmol de rc-secuencia señal de Igk-F y Fc-noXma-GS-R o Fc-noXma-GS-F y rcFc-R usando el sistema de alta fidelidad Expand™ (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante en un termociclador MJ. La primera reacción se realizó con 500 ng de colección de ADNc de leucocitos (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) como molde usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos); 72 °C 10 minutos. La segunda reacción se realizó con 500 ng de pSYN-Fc-001 (anterior) como molde usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 minutos; 16 ciclos de (94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 45 segundos); 72 °C 10 minutos. Las bandas de tamaño esperado (~495 y 299 pb, respectivamente) se purificaron del gel con un kit de extracción de gel (Qiagen, Valencia, CA), después se combinaron en una reacción de PCR con 25 pmol de cebadores rc-secuencia señal de Igk-F y rcFc-R y desarrollada anteriormente, hibridando a 58 °C y continuando durante 16 ciclos. La banda de tamaño esperado (~772 pb) se purificó del gel con un kit de extracción de gel (Qiagen, Valencia, CA), y se clonó en pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) para producir un plásmido intermedio pSYN-Fc-007 (pGEM T-Easy/Igk sig seq-Fc). El casete completo de secuencia señal de Igk-Fc entonces se subclonó usando los sitios HindIII y EcoRI en vector de expresión de mamífero pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para generar pSYN-Fc-015 (pcDNA3/Igk sig seq-Fc).

La secuencia de ácido nucleico para el inserto en pSYN-Fc-015 se proporciona como SEQ ID NO:63, en que la secuencia señal (primeros 60 nucleótidos) se muestra en cursiva.

SEQ ID NO:63

atggagacag acacactect gctatgggta ctgctgctct ggyttccagg tccaactggt
gacaaaaactc acacatgccc accgtgcccc gctccggaac tgctggggcg accgtcagtc
ttcctcttcc ccccaaaacc caagacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
tgogtggtgg tggacgtgag ccacgaaagac ectgaggtca agttcaactg gtacgtggac
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaag cgcggggagg agbagtacaa cagcacgtac
cgtgtggtca gcytctcacc cgtcctgca caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
tgcaaggtct ccaacaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccocat cccgggatga gctgaccaag
aaccaggta gctgacctg cctggtcaaa ggcctctatc ccagcgacat cgcctgggag
tgggagagca atgggcagcc ggagaaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
ctctccctgt ctccgggtaa a

Para la selección de la región Fc, se usó un péptido señal heterólogo, específicamente la secuencia señal de la cadena ligera de Igk de ratón, como se encuentra en el n.º de acceso a GenBank AB050084, ARNm de VL2C de *Mus musculus* para anticuerpo anti-A/dT. En la región Fc, la secuencia de nucleótidos se modificó para que incorporara sitios de endonucleasa de restricción, mientras se conservaba la secuencia codificante. Específicamente, los codones para A231, P232 y E233 (numeración EU) se modificaron de GCA CCT GAA en la secuencia de nucleótidos para la región Fc de IgG1 en el n.º de acceso de Genbank Y14735 a GCT CCG GAA en los nucleótidos 93 y 96 para incorporar un sitio de restricción BspEI mientras se conserva el código de aminoácido. Además, los codones para G236, G237 y P238 (numeración EU) se modificaron de GGG GGA CCG a GGC GGA CCG en el nucleótido 108 en para incorporar un sitio de restricción RsrII mientras se conserva el código de aminoácido. Además, hay una diferencia no codificante en Leu 234 de CTC a CTG en el nucleótido 102, una diferencia no codificante en R465 de CGG a CGC en el nucleótido 465, y una diferencia no codificante en L640 de CTG a ITG en el nucleótido 592.

La secuencia de aminoácidos para el producto traducido codificado por SEQ ID NO:63 se proporciona como SEQ ID NO:64, donde el péptido señal (primeros 20 residuos) se muestra en cursiva.

SEQ ID NO:64

METDTLLLV LLLWVPGSTG DKYHTCPFCF APPELLGGPSV ELFPPKPKDT LMISRTPEVT 60
CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK FREQYNSY RVVSVLTVLR QDNLNGREYK 120
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYI LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180
WESNGQPENN YKTTTPVLDG DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALANKHYTQKS 240
LSLSPGK 247

Ejemplo 2

Clonación de construcciones que expresan FIX-Fc

Se usaron los siguientes cebadores para generar las diversas construcciones de expresión de FIX-Fc (las regiones que hibridaban con el molde inicial se indican en negrita).

NatFIX-F: 5'- TTA**CTGCAGAAGGTTATGCAGCGCGTGAACATG** -3' (SEQ ID NO:26)

F9-R-ZTM: 5'- **AGTGAGCTTTGTTTTTTCCTTAATCC** -3' (SEQ ID NO:27)

**FIXaddXba-F: 5'- CAAGCGAATCTAGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAA-
GTG -3' (SEQ ID NO:28)**

FIXaddXba-R: 5'- **ACATTCTCTCTCTAGATTCCCTTGAACAAACTCTTCC** -3' (SEQ ID NO:29)

pEDF1-F: 5'- **ATGACATCCACTTTGCCTTCTCT** -3' (SEQ ID NO:30)

fcclv-R: 5'- **ATAGAAGCCTTTGACCAGGC** -3' (SEQ ID NO:31)

FIX-Fc delta-F: 5'- AAAAACAAGCTCACTGACAAAACTCACACATG-
CCCACC** -3' (SEQ ID NO:32)**

FIX-Fc delta-R: 5'- GTGTGAGTTTTGTCAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTT-
AATCCAG** -3' (SEQ ID NO:33)**

IgkFc-NotI-F: 5'- **ATGCGGCCGCGCCGCCACCATGGAGACAGACACTC** -3' (SEQ ID NO:34)

Fc-Xho-R: 5'- **ATCTCGAGTCATTTACCCGGAGACAG** -3' (SEQ ID NO:35)

FIXa5: 5'-GTCAAAGCTTCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAGCGCGTG-
AACATGATC** -3' (SEQ ID NO:36)**

FIXa3: 5'- **CTGTGATGTTCCACAGTACTTACCAACCTGCGTG** -3' (SEQ ID NO:37)

FIXb5: 5'- **AGTACTGTGGGAACATCACAG** -3' (SEQ ID NO:38)

FIXb3: 5'- **TGACTCTAGATTCCCTTGAACAAACTCTTCCAA** -3' (SEQ ID NO:39)

Construcción de plásmidos de expresión de FIX-Fc

La construcción de los plásmidos de expresión de FIX-Fc comenzó con reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR) de la secuencia codificante de FIX, seguida de la generación de varios plásmidos intermedios diferentes usados para la expresión durante las fases iniciales de investigación antes de que se crearan los tres plásmidos finales: pSYN-FIX-021, pSYN-FIX-027 y pSYN-FIX-030. Las construcciones finales de FIX-Fc se prepararon todas de modo que la región codificante de FIX se fusionara directamente a la secuencia codificante de Fc, sin conector intermedio.

La secuencia de factor IX (FIX) natural (n.º de acceso a GenBank NM_000133) se obtuvo por RT-PCR a partir de ARNm de hígado adulto humano usando los cebadores NatFIX-F y F9-R-ZTM con la RT-PCR Invitrogen Superscript con kit Platinum Taq de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante. El ciclo usado fue 30 min a 50 °C para la retrotranscripción, seguido de desnaturalización a 94 °C durante 2 min y 35 ciclos de (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min), seguido de 10 min de extensión a 72 °C y después almacenamiento a 4 °C. El fragmento de PCR resultante se subclonó en el vector pGEM-T-Easy para generar pSYN-FIX-001. La secuencia completa entonces se amplificó usando una versión extendida de estos dos cebadores para añadir sitios de restricción (5' BsiWI), secuencia Kozak y un conector, y se amplificó adicionalmente en tres reacciones de PCR para añadir la secuencia de Fc y se subclonó para crear pSYN-FIX-002, para expresar FIX-Fc N297A en un sistema de vector diferente (pEE12.4/FIX-Fc N297A). Otras secuencias fuera de la secuencia codificante de FIX se subclonaron en pSYN-FIX-002 para crear pSYN-FIX-003 (pEE12.4-6.4/FIX-Fc N297A/PACE) y pSYN-FIX-004 (pEE12.4-6.4/FIX-Fc N297A/KEX2), antes de que se subclonara la secuencia de FIX en un sistema de expresión diferente, pSYN-FIX-011 (pED.dC/FIX-Fc N297A).

El sitio XbaI se añadió a la secuencia de FIX de una manera similar a esa en que el sitio XmaI se retiró de Fc, anteriormente. En resumen, los cebadores internos FIXaddXba-F y FIXaddXba-R se usaron para añadir el sitio XbaI mientras se conserva la secuencia de aminoácidos. Se realizaron dos reacciones de PCR de 25 µl con 50 pmol de pEDF 1-F y FIXaddXba-R o FIXaddXba-F y fcclv-R usando el sistema de alta fidelidad Expand™ de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante en un termociclador MJ. Ambas reacciones se realizaron con 500 ng de pSYN-FIX-011 como molde usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 min; 14 ciclos de (94 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 2 min); 72 °C 10 min. Las bandas del tamaño esperado (~290 y 1698 pb, respectivamente) se escindieron de un gel de agarosa y se purificó el ADN con un kit de extracción de gel, después se combinó en una reacción de PCR con 50 pmol de cebadores pEDFI-F y fcclv-R y se desarrolló como anteriormente, hibridando a 48 °C y continuando durante 14 ciclos. El plásmido pSYN-FIX-011 se usó como molde, y los cebadores pEDFI-F y fcclv-R externos a los sitios de restricción PstI (5') y Sall (3') se usaron en el mismo tipo de tres reacciones de PCR para generar la secuencia de aminoácidos de FIX idéntica mientras se incorporaba el sitio de restricción XbaI. El fragmento de 1965 pb resultante se digirió con PstI/Sall, y se subclonó de vuelta en los mismos sitios en pSYN-FIX-011 para generar pSYN-FIX-013 (pED.dC/FIX-Fc N297A con sitio XbaI). La secuencia Fc N297A posteriormente se cortó y reemplazó con la secuencia natural para generar pSYN-FIX-016 (pED.dC/FIX-Fc con sitio XbaI).

La secuencia para la región codificante de FIX-Fc final (sin ningún conector) se generó de una manera similar. En resumen, los cebadores internos FIX-Fc delta-F y FIX-Fc delta-R, que hibridan con la secuencia de Fc o FIX con un saliente correspondiente de FIX o Fc, se usaron para retirar la región de conector. Se realizaron dos reacciones de PCR de 25 µl con 10 pmol de pEDFI-F y FIX-Fc delta-R o FIX-Fc delta-F y rcFc-R usando polimerasa de alta fidelidad Expand™ similar al protocolo convencional del fabricante, sustituyendo en tampón E Failsafe™, en reacciones de 10 µl en el Rapidcycler. Ambas reacciones se realizaron con 500 ng de pSYN-FIX-016 (pED.dC/FIX-Fc con XbaI) como molde usando los siguientes ciclos: 94 °C 1 min; 14 ciclos de (94 °C 0 s, 52 °C 0 s, 72 °C 90 s, pendiente 6,0); 72 °C 10 min. Las bandas de tamaño esperado (~1496 y 710 pb, respectivamente) se escindieron de un gel de agarosa y se purificó el ADN con el Eppendorf Perfectprep Gel Cleanup Kit®, después se combinó en una reacción de PCR con 10 pmol de cebadores pEDFI-F y rcFc-R y se desarrolló como anteriormente, hibridando a 52 °C y continuando durante 14 ciclos. El fragmento de 2200 pb resultante se digirió con XbaI/RsrII, y el fragmento de 1255 pb resultante se subclonó de vuelta en los mismos sitios en pSYN-FIX-016 para generar pSYN-FIX-020 (pED.dC/FIX-Δconector-Fc con sitio XbaI).

La secuencia FIX-Δconector-Fc posteriormente se cortó y se subclonó en los sitios EcoRI/HindIII de pcDNA4/myc-HisC para generar pSYN-FIX-021 (pcDNA4/FIX-Fc con sitio XbaI). Obsérvese que, aunque este vector puede usarse para añadir las marcas myc y His a la proteína de interés, este plásmido se construyó de tal manera que solamente produjera la proteína FIX-Fc sin marcas.

Se proporciona una secuencia de nucleótidos para FIX-Fc en pSYN-FIX-021, que incluye el prepro péptido, como SEQ ID NO:65.

SEQ ID NO:65

```
atgcagcgcg tgaacatgat catgpcagaa tcaccaggec tcatcaccat ctgcctttta
ggatactctac tcagtgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaatt
ctgaatcggc caaagaggta tsattcaggt aaattggaag agtttggtca agggaatcta
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgagaag cagcagaagt tttgaaaac
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat
ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc
tttgatcttg aaggaaaga ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga
tgccagcagf tttgtaaaaa tagtctgat aacaagggtg tttgctctg tactgagggg
tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga
gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac
tatgtaaatt ctactgaagc tgaaccatt ttggatgaca tcaactaaag cccccaatca
tttaatgact tcaactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attccttgg
caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttcctgagg gctctatcgt taatgaaaa
tggattgtaa ctgtgtcca ctgtgtgaa actggtgta aaattacagt tgtgcaggt
```

40

```

gaacataata ttgagygagc agaacataca gagcaaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt
cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa
ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaacct tttgcat tgc tgacaaggaa
tacacgaaca tcttctcaa atttggatct ggtctatgta gttggtgggg aagagtcttc
cacaaggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccaactgt tgaccgagcc
acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat
gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa
gggaaccggt tcttaactgg aattatttagc tgggtggaag agtgtgcaat gaaaggcaaa
tatggaatat ataccaaggf gtcocggtat gtcactgga ttaaggaaaa acaaaagctc
actgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagctccgg aactctctggg cggaccgtca
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccttgaggtc
acatgcgtgg tgggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg
gaaggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcagc
tacctgtgtg tcaagctctt caccgtctct caccaggact ggtgcaatgg caaggagtac
aagtgcgaag tctcaacaaa agccctccca gccccatcg agaaaaaccat ctocaaagcc
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc
aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgto aaaggcttct atcccagcga catcgcctg
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgttgac
tccgcctgct ccttctctct ctacagcaag ctcaactgtg acaagagcag gtggcagcag
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgat gaggctctgc acaaccacta cccgcagaag
agcctctccc tgtctccggg taas

```

5 La secuencia de nucleótidos en la parte de factor IX se modificó a partir de los que está presente en GenBank para incorporar un sitio XbaI sin cambiar el código de aminoácido. Específicamente, la secuencia codificante en la región N59, L60 y E61 se cambió de AAC CTT GAG a AAT CTA GAG en los nucleótidos 177 y 180, que añade un sitio de restricción XbaI. También hay un cambio no codificante en V447 de GTA a GTG en el nucleótido 1341. En la región Fc, la secuencia de nucleótidos se modificó para que incorporara sitios de endonucleasa de restricción, mientras se conservaba la secuencia codificante. Específicamente, los codones en la región para A472, P473 y E474 (numeración EU de Fc 231-233) se modificaron de GCA CCT GAA en la secuencia de nucleótidos para la región Fc de IgG 1 en el n.º de acceso a GenBank Y14735 a GCT CCG GAA en los nucleótidos 1416 y 1419 para incorporar un sitio de restricción BspEI mientras se conserva el código de aminoácido. Además, los codones en la región para G477, G478 y P479 (numeración EU de Fc 236-238) se modificaron de GGG GGA CCG a GGC GGA CCG en el nucleótido 1431 para incorporar un sitio de restricción RsrII mientras se conserva el código de aminoácido. Finalmente, hay una diferencia no codificante en L640 de CTG a TTG.

15 La secuencia de aminoácidos de FIX-Fc codificada por SEQ ID NO:65 se proporciona como SEQ ID NO:66, en donde la secuencia señal (28 residuos) se muestra en cursiva y el propéptido (18 residuos) se muestra en negrita.

SEQ ID NO:66

```

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSASCTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL 60
ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGCKD DINSYECWCP 120
FGFEGKNCBL DVTGNIKNGR CEQFCCKNSAD NKVVCSTEG YRLAENQKSC EPAVFFPCGR 180
VSVSQTFSKLY RAETVFPDVD YVNSTEAETI LDNIYQSTQS FNDFTRVVGQ EDAKFGQFPW 240
QVVLNGKVDA FCGGSIVNEK NIYTAHCVE TGVKITVAVG ERNIEETEHT EQKRNVIKII 300
PHHNYNAAIN KYNHDIALE LDEPLVLSY VTFICIAKKE YTNIFLKFSG GYVSGWGRVF 360
HKGRSALVLO YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGKSDSCQGD SGGPHVTEVE 420
GTSFLTGIIS WGEECAMKKG YGIYTRVSRV VNWIREKTKL TDKHTHCDFC PAFELLGGPS 480
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH E DPEVKENWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 540
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELFT 600
KNOVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTFPPVLD SDGSEFLYSK LTVDKSRWQQ 660
GNVFSCSVMH EALHNRVTQK SLSLSPGK 688

```

20 **Construcción de un solo plásmido para la coexpresión de FLF-Fc y Fc**

Para la construcción del único plásmido para la expresión de FIX-Fc y Fc, se añadieron diferentes sitios de restricción a la secuencia codificante de péptido señal de Igx de ratón-Fc usando los cebadores IgkFc-NotI-F y Fc-Xho-R. El molde para esta reacción de PCR fue pSYN-Fc-011 (pGEM T-Easy/secuencia señal de Igx-Fc sin sitios BspEI, RsrII). Se configuró una reacción de PCR de 10 µl con 100 ng de molde y 50 pmol de cada cebador usando la polimerasa de alta fidelidad Expand™ complementada con tampón E Failsafe™ en el Rapid Cyclor. La reacción de PCR se realizó usando los siguientes ciclos: 94 °C durante 1 min; 15 ciclos de (94 °C durante 0 min, 48 °C durante 0 min y 72 °C durante 1 min) seguido de una extensión final de 72 °C durante 10 min. El producto de PCR se procesó en un gel de agarosa, y el fragmento esperado de ~700 pb se escindió y se purificó el ADN usando un kit de extracción de gel QIAquick. El producto de PCR se clonó en pCR2.1-Topo. La secuencia codificante de péptido señal de Igx de ratón-Fc se clonó entonces en pBudCE4.1 usando los sitios de restricción NotI/XhoI.

La secuencia de nucleótidos para la región Fc en pBudCE4.1 (así como en pSYN-FIX-027 y pSYN-FIX-030, a continuación) se proporciona como SEQ ID NO:67.

SEQ ID NO:67

```
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggtccagc ttccactggt
gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcttgggagg accgtcagtc
ttctctctcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct ccgggacccc tgaggtcaca
tgctgtgtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtactgtggac
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac
cgtgtgtgta gcttctctac cgtctctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
tgcaaggctc ccaacaagc cctccnagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat ccgctgatga gctgaccaag
aaccaggtca gctgacctg cctgtgcaaa gcttctctat ccagcgacat cggcgtggag
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accytggaca agagcaggtg gcagcagggg
aacgtctctc catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
ctctccctgt ctccgggtaa a
```

La misma secuencia señal de Igx de ratón usada en pSYN-Fc-015 se utilizó para esta construcción. En la región Fc, la secuencia de nucleótidos se modificó para que incorporara un sitio de endonucleasa de restricción, mientras se conservaba la secuencia codificante. En la región Fc hay tres diferencias no codificantes en comparación con la secuencia o la región Fc de IgG1 en el n.º de acceso a GenBank Y14735: G236 (numeración EU) se modificó de GGG a GGA en el nucleótido 108, R465 (numeración EU) se modificó de CGG a CGC en el nucleótido 465, y una diferencia no codificante en L640 (numeración EU) se modificó de CTG a TTG en el nucleótido 592.

La secuencia de aminoácidos es idéntica a la de pSYN-Fc-015 (SEQ ID NO:64).

FIX-Fc entonces se clonó en pBudCE4.1 que contenía la secuencia de IgkFc. FIX-Fc se escindió de pSYN-FIX-020 (anterior) usando las enzimas HindIII y EcoRI y se clonó en los mismos sitios en pBudCE4.1/IgkFc. El plásmido final que contenía FIX-Fc posterior al promotor de CMV e IgkFc posterior al promotor EF1α en pBudCE4.1 se denominó pSYN-FIX-027.

Construcción de un solo plásmido para la coexpresión de FIX-Fc (con un intrón I de FIX truncado) y Fc

Se generó una construcción de expresión de FIX-Fc adicional que incluía una forma truncada del intrón I de FIX (n.º de acceso a GenBank NC_000023), que había demostrado previamente aumentar el nivel de expresión de FIX debido a secuencias de empalme funcionales presentes en el ARNm precursor. Kurachi S *et al.* (1995) J Biol Chem. 270:5276-81. La parte truncada del intrón I de FIX se obtuvo por PCR inicialmente en dos trozos que entonces se ensamblaron juntos en una tercera reacción de PCR como sigue. Se realizaron dos reacciones de PCR de 50 µl con 45 y 90 pmol de cada uno de los cebadores FIXa5 y FIXa3 o FIXb5 y FIXb3 usando polimerasa de alta fidelidad Expand™ de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante en el termociclador MJ. Ambas reacciones se realizaron con ADN genómico humano como molde usando los siguientes ciclos: 94 °C 3 min; 16 ciclos de (94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s); 72 °C 13,5 min. Las secuencias de 141 y 157 pb de la región del extremo 5' y 3', respectivamente, del intrón I de FIX se obtuvieron y unieron por PCR en un segundo conjunto de reacciones de PCR que se realizaron como anteriormente, usando una mezcla de estos productos como nuevos moldes y los cebadores FIXa5 y FIXb3. Este fragmento se clonó inicialmente en el vector intermedio pCR2.1 TOPO para generar pSYN-FIX-028 (pCR2.1/miniintrón1 de FIX). El fragmento HindIII/XbaI que contenía el miniintrón de FIX dentro del contexto de la CDS de FIX ("minigén") entonces se subclonó en pSYN-FIX-027 para generar pSYN-FIX-030 (pBUD/FIX-miniintrón 1 de Fc/Fc).

Se proporciona una secuencia de nucleótidos para FIX-Fc en pSYN-FIX-030, que incluye el intrón, como SEQ ID NO:68. Esta secuencia de nucleótidos coincide con la de la construcción pSYN-FIX-021 (véase SEQ ID NO:65), aparte de la inserción en pSYN-FIX-030 del intrón truncado de 299 pb aproximadamente entre la secuencia codificante del péptido señal y la secuencia codificante del propéptido.

5

SEQ ID NO:68

```

atgcagcggc tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta
ggatatctac tcagtgtga atgtacaggt ttgtttcctt tttfaaaata cattgagtat
gottgccttt tagatataga aatatctgat gctgtcttct toactaaakt ttgattacat
gatttgacag caatattgaa gagtctaaca gccagcagcc aggttggtaa gtactgtggg
aaccatcacag attttgctc catgcccata agagaaattg gctttcagat tatttgattt
aaaaacaaag actttcttaa gagatgtaaa attttcatga tgttttcttt ttgtctaaaa
ctaaagaatt atctctttac atttcagttt ttcttgatca tgaanaagcc aacaaaatcc

tgaetcgccc aseqaggat aattcagyta aattggaaga gtttgttcaa gggaaatctag
agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagt tttganaaaa
ctgaagaaac aactgaattt tgaagcagc atgttgatgg agatcagtg gagtccaatc
catgttataa tggcggcagt tgcaggatg acatbaattc ctatgaatgt tgggtgtcctt
ttggatttga aggaagaac tgtgattag atgtaacatg taacattaag aatggcagat
ggcagcagtt ttgtaaaaa atgtctgata acaaggtggg ttgctcctgt aotgagggat
atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagc gccatttcca tgtggaagag
tttctgtttc acaaacttct aagctcacc ccgtctgagc tgttttctct gatgtggact
atgtaaatcc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc acccaatcat
ttaatgactt cactcggggt gttgggtggag aagatgccaa accaggtcaa tcccttggc
aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcgtt aatgaaaaat
ggattgtaac tgetgccac tgtgtgaaa ctggtgttaa aattacagtt gtgcgaggtg
aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aaatgtgatt cgaattatcc
ctcaccacaa ctacaatgca gctattaata agtaacaacca tgaatttccc etcttggaac
tggacgaacc cttagtgtca aacagctacg ttacacctat ttgcattgct gacaaggaat
acacgaacat ctctctcaaa ttggatctg gctatgtaag tggctgggga agagtcttcc
acaaagggag atcagcttta gttcttcaag acctagagt tcaacttgtt gaccgagcca
catgtctctg atctacaag ttcaccatct ataacaaact gttctgtgct ggcttccatg
aaggaggtag agattcatgt caaggagata gtgggggacc ccatgttaact gaagtggag
ggaccagttt cttaactgga attattagct ggggtgaaag gtgtgcaatg aaaggcaaat
atggaatata taccagggtg tcccggtatg tcaactggat taaggaaaaa acaaagctca
ctgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagctccgga actcctgggn ggaaccgtcag
tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca cctcctatgt ctcccggacc cctgaggtca
catgcttggg ggtggacgtg agccaagag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg
acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccggggga ggagcagtac aacagcacgt
accgtgtggt cagcgtctct accgtctctg accaggaact gctgaatggc aaggagtaca
agtgcagggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca
aagggcagcc ccgaagaaca caggtgtaca ccttgcctcc atcccggat gagctgacca
agaaccaggt cagcctgacc tgcctgttca aaggcttcta tcccagcagc atcgccgtgg
agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgttgact
ccgaaggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg
ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcat agcctctgca caaccactac aagcagaaga
gcctctccct gtctcgggtt aaa
    
```

10 La secuencia de aminoácidos de FIX-Fc resultante es idéntica a la de pSYN-FIX-021 y pSYN-FIX-027.

Ejemplo 3

Clonación de PC5

La secuencia codificante de PC5 humana se obtuvo por RT-PCR. Se usaron los siguientes cebadores (las áreas que hibridan con el ADNc se indican en negrita):

- 5 PCS-KpnIwF: 5'- **ATCTACACCATCTCCATCAGCAGC** -3' (SEQ ID NO:40)
- PCS NotI-R: 5'- AAGGCGGCCGCT**CAGCCTTCAAATGTACATGTTTTGC** -3' (SEQ ID NO:41)
- 10 PC5-UTR-F: 5'- **AGCGAGGGAGCAGCGAGG** -3' (SEQ ID NO:42)
- PC5-HindIII-R: 5'-**GGTAGTTGACATGGCGGTTGG** -3' (SEQ ID NO:43)
- PC5-Afl2-F: 5'- CAGCGACTTAAGCCACCAT**GGGCTGGGGGAGCCG** -3' (SEQ ID NO:44)
- 15 PC5-KpnI-R: 5'- **GTAGGTTGTGGCCAGCGTGG** -3' (SEQ ID NO:45)

La secuencia codificante de PC5 humana (n.º de acceso a GenBank NM_006200) se obtuvo en dos trozos. El 3' ~1750 pb se obtuvo usando los cebadores PC5-KpnI-F y PC5-NotI-R con Invitrogen Superscript RT-PCR con kit Platinum Taq de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante, a partir de ARNm de hígado humano. El ciclo usado para la retrotranscripción fue 30 min a 50 °C seguido de desnaturalización a 94 °C durante 2 min y 35 ciclos de 94 °C durante 15 s, 54 °C durante 30 s, 72 °C durante 3 min, seguido de 10 min de extensión a 72 °C y después almacenamiento a 4 °C. Esto produjo un fragmento desde el sitio KpnI interno en la secuencia codificante de PC5 hasta el codón de parada, con un sitio NotI añadido al extremo 3'. Este fragmento entonces se clonó en pCR2.1 TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante para generar pSYN-PC5-001 (pCR2.1/PC5 (KpnI-NotI)). Este fragmento entonces se subclonó en pcDNA3.1/hygro usando los sitios de restricción KpnI y NotI para generar pSYN-PC5-002 (pcDNA3.1/hygro/PC5 (KpnI-NotI)).

El 5' ~1100 pb de PC5 se obtuvo en dos etapas. En primer se amplificó por RT, usando los cebadores PC5-UTR-F y PC5-HindIII-R para amplificar un fragmento de ~1520 pb a partir de ARNm de hígado humano, usando condiciones similares como anteriormente, con una temperatura de hibridación de 57 °C. Estos cebadores tienen homología completa con la secuencia de PC5 natural, en la secuencia 5' no traducida y la secuencia 3' desde el sitio HindIII único interno, respectivamente. Obsérvese que este sitio HindIII no está presente en la construcción final debido a una sustitución sinónima de nucleótido. Este fragmento de ADN entonces se purificó del gel y se usó como molde para una segunda reacción de PCR con PCS-Afl2-F, que añade un sitio de clonación AflII seguido de una secuencia Kozak a la secuencia codificante N terminal en el extremo 5', y PC5-KpnI-R, que hibrida en 3' al sitio KpnI único interno, para generar un fragmento de ~1100 pb. La reacción se realizó con el sistema de alta fidelidad Expand™ de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante en un termociclador MJ usando los siguientes ciclos: 94 °C 2 min; 14 ciclos de (94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 2 min), seguido de 72 °C 10 min. Este fragmento entonces se subclonó en pSYN-PC5-002 usando los sitios de restricción AflII y KpnI para generar pSYN-PC5-003 (pcDNA3.1/hygro/PC5).

La secuencia de nucleótidos que codifica PC5 en pSYN-PC5-003 tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 61):

SEQ ID NO:61

```

atgggctggg ggagccgctg ctgctgcccg ggacgctttg aectgctgtg cgtgctggcg
ctgctcgggg gctgectget ccccggtgtt cggacgcgcg tctacacca a cactggggca
gtcaaaatcg cggggggctt cccggaggcc aaccgtatcg ccagcaagta cggattcatc
aacataggac agataggggc cctgagggac tactaccact tctaccatag caggacgatt
aaaaggtcag ttatctcgag cagagggacc cacagtttca ttccaatgga accaaaggtg
gaatggatcc aacagcaagt ggtaaaaaag cggacaaaga gggattatga ettcagtcgt
gcccagtcct cctatttcaa tgatcccagc tggcccagta tgtggtatat gcactgcagt
gacaatacac atccctgcca gtcctgacatg aatatcgaag gagcctgga gagaggctac
acgggaaga acattgtggt cactatcctg gatgacggaa ttgagagaac caatccagat
ctgatgcaa aetacgatgc tctggcaagt tgcgacgtga atgggaatga ctggaccaca
atgcccctgt atgatgcaag caacgagaac aagcatggga ctgctgtgtc tggagaagtg
gcagccgctg caaacaattc gcactgcaca gtcggaattg ctttcaacgc caagatcggg
ggagtgcgaa tgctggacgg agatgtcacg gacatgyttg aagcaaatc agttagcttc
aacccccagc acgtgcacat ttacagcgc agctggggcc cggatgatga tggcaagact
gtggacggac cagccccct cacccggcaa gcccttgaaa acggcgttag aatggggcgg
agaggcctcg gctctgtgtt tgtttgggca tctggaaatg gtggaaggag caaagccac
    
```

tgcctccrctg atggetacac caacagcato tacaaccatct coactcagcag caactgcagaa
 agcggaaaga aaccttggta cctggaagag tgttcatcca cgctggccac aaactacagc
 agcggggagt cctacgataa gaaaatcctc actacagatc tgaggcagcg ttgcacggac
 aaccacactg ggacgtcagc ctcagcccc atggctgcag gcabcattgc gctggccctg
 gaagccaatc cgtttctgac ctggagagac gtacagcatg ttattgtcag gacttcccgt
 gcgggacatt tgaacgctaa tgactggaaa accaatgctg ctggtttttae ggtgagccat
 ctttatggat ttggactgat ggaocgagaa gccatggta tggaggcaga gaagtggacc
 accgttcccc ggacgacagt gtgtgtggag agcacagacc gacaaatcaa gacaatccgc
 cctaaccgtg cagtgcgctc catctacaaa goctcaggct gctcagataa ccccaaccgc
 catgtcaact acctggagca cgtcgttctg cgcatoacca tcacccaccc caggagagga
 gacctggcca tctaccgac ctcccccctt ggaactaggc ctacgctttt ggcacaacag
 ctatttgatc actccatgga aggatcaaa aactgggagt tcatgaccat tcaattgctg
 ggagaasagc ctgctggtga ctgggtcctt gaagttttatg atactccctc tcagctaagg
 aactttaaga ctccaggtaa attgaaagaa tggctcttgg tctctacgg caactccgtg
 cagccatatt caccaccaa tgaatttccg aaagtggaa ggttccgcta tagccgagtt
 gaagaccca cagacgacta tggcacagag gattatgcag gtcctgcga ccttgagtgc
 agtgagggtg gctgtgacgy gccaggacca gaccactgca atgactgttt gcaactactc
 tacaagctga aaaacaatac caggatctgt gtctccagct gccccctgg ccaactacc
 gccgacaaga agcgtcgcag gaagtgtgc cccactgtg agtccctgctt tgggagccat
 ggtgaccaat gcatgtcctg caaatatgga tactttctga atgaagaaac caacagctgt
 gttactcact gcoctgatgg gtcaratcag gataccaaga aaaaatcttg ccggaatgc
 agtgaaaact gcaagacatg tactgaattc cataactgta cagaatgtag gcatgggtta
 agcctgcaggy gatcccggtg ctctgtctcc tgtgaagatg gacggfattt caacggccag
 gactgccagc cctgccaccg cttctgcgcc acttgtgctg gggcaggagc tgatgggtgc
 attaactgca cagagggcta cttcatggag gatgggagat gcgtgcagag ctgtagtatc
 agctattact ttgaccactc ttcagagaat ggatacaaat cctgcacaaa atgtgatatc
 agttgtttga cgtgcaatgg cccaggatcc aagaactgta caagctgccc tagtgggtat
 cctttagact taggaatgtg tcaaatggga gccatttgcg aggatgcaac ggaugagtc
 tgggcggaag gaggtctctg tatgcttctg aaaaagaaca atctgtgcca acggaaggtt
 cttcaacaac tttgctgcaa aacatgtaca tttcaagc

SEQ ID NO:61 contiene sustituciones de la secuencia de GenBank que no afectan a la secuencia codificante de aminoácidos. Específicamente, el nucleótido en la posición 399 (correspondiente a la posición 876 del n.º de acceso a GenBank NM_006200) es una T en lugar de una C, pero conserva el aminoácido Ser 133 (correspondiente a la numeración de aminoácidos en el n.º de acceso a GenBank NP_006191); la posición del nucleótido 1473 (posición 1950 en GenBank) a una C en lugar de una T, pero conserva el aminoácido Ala 491; y la posición del nucleótido 1485 (posición 1962 en GenBank) es una A en lugar de una G, pero conserva el aminoácido Ser 496. Obsérvese que el cambio nucleotídico en la posición 1473 elimina un sitio de restricción de HindIII.

Ejemplo 4

Clonación de PACE-SOL

La secuencia codificante de PACE humana se obtuvo por RT-PCR. Se usaron los siguientes cebadores (las áreas que hibridan con el ADNc se indican en negrita):

PACE-F1: 5'- GGTAAGCTTGCC**ATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGC** -3' (SEQ ID NO:46)

PACE-R1: 5'- GTTTT**CAATCTCTAGGACCCACTCGCC** -3' (SEQ ID NO:47)

PACE-F2: 5'- **GCCAGGCCACATGACTACTCCGC** -3' (SEQ ID NO:48)

PACE-R2: 5'- GGTGAATTCTCA**CTCAGGCAGGTGTGAGGGCAGC** -3' (SEQ ID NO:49)

El cebador PACE-F 1 añade un sitio HindIII al extremo 5' de la secuencia de PACE que empieza con 3 nucleótidos antes del codón de inicio, mientras el cebador PACE-R2 añade un codón de parada después del aminoácido 715, que

5 existe en el extremo del dominio extracelular de PACE, y también añade un sitio EcoRI al extremo 3' del codón de
parada. Los cebadores PACE-R1 y PACE-F2 hibridan en los lados 3' y 5' de un sitio BamHI interno, respectivamente.
Entonces se configuraron dos reacciones de RT-PCR usando 25 pmol de cada uno de los pares de cebadores de
PACE-F1/R1 o PACE-F2/R2 con 20 ng de ARN de hígado humano adulto (Clontech; Palo Alto, CA) en una reacción
10 de RT-PCR de 50 µl usando SuperScript™ One-Step RT-PCR con sistema PLATINUM® Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA)
de acuerdo con el protocolo del fabricante. La reacción se realizó en un termociclador MJ usando los siguientes ciclos:
50 °C 30 minutos; 94 °C 2 minutos; 30 ciclos de (94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 2 minutos), seguido
de 72 °C 10 minutos. Estos fragmentos se ligaron cada uno en el vector pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) y se
secuenciaron completamente. El fragmento F2-R2 entonces se subclonó en pcDNA6 V5/His (Invitrogen, Carlsbad,
CA) usando los sitios BamHI/EcoRI, y después el fragmento F1-R1 se clonó en esta construcción usando los sitios
HindIII/BamHI. El plásmido final, pcDNA6-PACE, produce una forma soluble de PACE (aminoácidos 1-715), ya que se
ha eliminado la región transmembranaria. La secuencia de PACE en pcDNA6-PACE es esencialmente como se
describe en Harrison S *et al.* (1998) *Semin Hematol* 35(2 Suppl 2):4-10.

15 **Ejemplo 5**

Clonación de Kex2-SOL

20 La secuencia codificante de la endoproteasa de levadura, KEX2, se obtuvo por RT-PCR de ARNm poliA+ de
Saccharomyces cerevisiae (BD Clontech, cat. n.º 6999-1) usando los siguientes cebadores (las áreas que hibridan
con el ADNc se indican en negrita):

KEX2-F: 5'- GCGCTAGCCGTACGGCCGCCACCAT**GAAAGTGAGGAAATA-TACTACTTTATGC** -3' (SEQ ID
NO:50)

25 KEX2-BglIII-F: 5'- **GCTATTGATCACAAAGATCTACATCCTCC** -3' (SEQ ID NO:51)

KEX2-BglIII-R: 5'- **GGAGGATGTAGATCTTTGTGATCAATAGC** -3' (SEQ ID NO:52)

30 KEX2-675-R: 5'- GCGAATICCGGTCCGTCATT**GCCCTAGGGCTCGAGAG-
TTTTTTAGGAGTGTGGATCAG** -3' (SEQ ID NO:53)

35 Estos cebadores se usaron para obtener la secuencia codificante de KEX2 (aminoácidos 1-675), el homólogo de
levadura de PACE, en dos trozos de una manera similar a la usada para PACE-SOL, ejemplo 4 anterior; asimismo, la
región transmembranaria se eliminó para generar la forma soluble de la proteína.

Ejemplo 6

Clonación de PC7 SOL

40 La secuencia codificante de PC7 se obtuvo por RT-PCR de ARNm de hígado adulto humano usando los siguientes
cebadores (las áreas que hibridan con el ADNc se indican en negrita):

45 PC7-BamMut-F: 5'- **GCATGGACTCCGATCCCAACG** -3' (SEQ ID NO:54)

PC7-BamMut-R: 5'- **CGTTGGGATCGGAGTCCATGC** -3' (SEQ ID NO:55)

PC7-F: 5'- GGTAAGCTTGCCGCCACCAT**GCCGAAGGGGAGGCAGAAAG** -3' (SEQ ID NO:56)

50 PC7-SOL-R: 5'- TTTGAATTCTCAGTT**GGGGGTGATGGTGTAACC** -3' (SEQ ID NO:57)

PC7-Xma-F: 5'- **GGCACCTGAATAACCGACGG** -3' (SEQ ID NO:58)

55 PC7-Xma-R: 5'- **CGTCACGTTGATGTCCCTGC** -3' (SEQ ID NO:59)

Estos cebadores se usaron para obtener la secuencia codificante de PC7 (aminoácidos 1-663) en tres trozos de una
manera similar a la usada para PACE-SOL, ejemplo 4 anterior; asimismo, la región transmembranaria se eliminó para
generar la forma soluble de la proteína.

60 **Ejemplo 7**

Generación de anticuerpo contra propéptido

65 Se sintetizó un péptido con la secuencia TVFLDHENANKILNRPKRC (SYN1117; SEQ ID NO:60) correspondiente a la
secuencia de propéptido de 18 aminoácidos de FIX, con un residuo de Cys añadido al extremo C para la conjugación

con hemocianina de lapa californiana (KLH). Este péptido se conjugó con KLH, se inmunizaron dos conejos blandos New Zealand y se recogieron los anticuerpos.

5 El péptido SYN 1117 se conjugó con gel de yodoacetilo Ultralink® (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El péptido ligado al gel posteriormente se compactó en una columna y entonces el anticuerpo se purificó por afinidad sobre la columna de propéptido inmovilizado por flujo de gravedad. Se filtraron 10 ml de antisuero a través de un filtro de jeringa estéril de 0,2 µm para retirar la materia en partículas. Entonces se aplicó el antisuero a la columna en fracciones de 1,5 ml, que dejaron unir, cada una de ellas, a la resina durante 1 hora. La columna se lavó con PBS, y el anticuerpo purificado se eluyó en glicina 100 mM, pH 2,8, después se neutralizó con Tris 1 M, pH 9,0. Las fracciones que contenían anticuerpo (determinadas por A280) se combinaron y dializaron en PBS y se añadió azida de sodio al 0,2 % para almacenamiento.

Ejemplo 8

15 Transfección de líneas

Transfecciones de HEK 293

20 Se adaptaron células HEK 293H a cultivo adherente usando medio que contenía suero. Se transfirieron células en suspensión a un matraz T75 que contenía medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (alto en glucosa) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y aminoácidos no esenciales 0,1 mM y se cultivaron como cultivos estacionarios a 37 °C/5 % de CO₂. Las células HEK 293H adherentes se cubcultivaron cada tres a cuatro días. El subcultivo se realizó desalojando las células del fondo del matriz por pipeteo suave del medio arriba y abajo.

25 Placas de 10 cm²

30 Se sembraron placas de 10 cm² con 2,5 × 10⁶ células en 10 ml de medio de cultivo adherente un día antes de la transfección. Las transfecciones se realizaron usando reactivo de transfección Profection de fosfato de calcio (Promega, Madison, WI). Tres horas antes de la transfección, el medio se reemplazó con 10 ml de medio de cultivo reciente. Para cada transfección, se añadieron 500 µl de solución salina tamponada con HEPES 2× (HBS 2×) a un tubo estéril. En un segundo tubo estéril, se mezclaron 20 µg de ADN (9 µg de FIX-021/9 µg de Fc-015/2 µg de PC5-003 o 9 µg de FIX-027/9 µg de Fc-015/2 µg de PC5-003 o 9 µg de FIX-030/9 µg de Fc-015/2 µg de PC5-003) con 62 µl de CaCl₂ 2 M y el volumen total aumentó hasta 500 µl con agua estéril. La mezcla de ADN/CaCl₂ se añadió gota a gota al HBS 2× mientras se agitaba con vórtice. La mezcla de ADN se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se agitó con vórtice de nuevo brevemente antes de añadirla gota a gota a las células. Las células se incubaron con la mezcla de ADN durante 16 horas a 37 °C/5 % de CO₂ antes de retirar la solución de transfección, lavando las células con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y después añadiendo 10 ml de medio de cultivo reciente a las células.

40 A las 48 a 72 horas después de la transfección, las células se retiraron de las placas de 10 cm² por pipeteo arriba y abajo y se dividieron en placas de 10 cm² en 5 ml de medio de cultivo reciente o se dividieron en placas de 96 pocillos con 100 µl de medio de cultivo por pocillo. A las 24 horas después de la siembra en placa, se inició la selección añadiendo un volumen igual de medio de cultivo que contenía el antibiótico apropiado para dar las concentraciones finales de higromicina a 200 µg/ml o zeocina, geneticina e higromicina a 25, 75 y 25 µg/ml. Una vez empezaron a formarse colonias de células resistentes al antibiótico, las células se aislaron de las placas de 10 cm² con anillos de clonación o se expandieron de placas de 96 pocillos a placas de 24 pocillos, después a matraces T25 y matraces T75 antes de adaptar las líneas celulares de vuelta cultivo en suspensión sin suero. Como las células se transfirieron de placas de 96 pocillos y placas de 10 cm² a placas de 24 pocillos, la concentración de antibiótico se disminuyó a la mitad y las células entonces se mantuvieron en este medio reducido en antibiótico.

50 Placas de 6 pocillos

55 Se sembraron placas de 6 pocillos con 5 × 10⁵ células en 2 ml de medio de cultivo adherente un día antes de la transfección. Las transfecciones se realizaron usando reactivo de transfección Profection de fosfato de calcio (Promega, Madison, WI). Tres horas antes de la transfección, el medio se reemplazó con 2 ml de medio de cultivo reciente. Para cada transfección, se añadieron 83 µl de HBS 2× a un tubo estéril. En un segundo tubo estéril, se mezclaron 4 µg de ADN (3,6 µg de FIX-027/0,4 µg de PC5-003) con 10 µl de CaCh 2 M y el volumen total aumentó hasta 83 µl con agua estéril. La mezcla de ADN/CaCh se añadió gota a gota al HBS 2× mientras se agitaba con vórtice. La mezcla de ADN se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se agitó con vórtice de nuevo brevemente antes de añadirla gota a gota a las células. Las células se incubaron con la mezcla de ADN durante 16 horas a 37 °C/5 % de CO₂ antes de retirar la solución de transfección, lavando las células con HBSS y después añadiendo 2 ml de medio de cultivo reciente a las células.

65 A las 40 a 72 horas después de la transfección, las células se retiraron de las placas de 6 pocillos por pipeteo arriba y abajo y transfiriendo las células matraces T75. A las 24 horas después de la siembra en placa, se inició la selección añadiendo un volumen igual de medio de cultivo que contenía higromicina a una concentración final de 200 µg/ml.

Una vez se generó una combinación de células seleccionadas de forma estable, las células se contaron y diluyeron hasta 1 célula/pocillo en placas de 96 pocillos. Según se volvían confluyentes las líneas celulares clonales, las células se expandieron de placas de 96 pocillos a placas de 24 pocillos, matraces T25 y T75 y entonces se adaptaron de vuelta a cultivo en suspensión sin suero como se describe anteriormente.

Todas las demás transfecciones de HEK se realizaron de una manera similar, sustituyendo los plásmidos de expresión de Kex2-SOL o PC7-SOL en el lugar de PC5. Para estas transfecciones, se usó reactivo de transfección Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante en lugar de fosfato de calcio.

Las transfecciones de CHO se realizaron de una manera similar, utilizando plásmidos de expresión de FIX-Fc similares con los mismos plásmidos de expresión de enzima de procesamiento. En algunos casos, se usó reactivo de transfección SuperFect (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante en lugar de fosfato de calcio.

Ejemplo 9

Análisis de líneas celulares transitorias y estables: Transferencia de Western

Para el análisis de todas las transfecciones transitorias, las transfecciones estables en CHO de FIX-Fc con PC5, y las transfecciones estables en HEK 293 de FIX-Fc con PC7, los medios acondicionados de las células se sometieron a inmunoprecipitación con proteína A. En resumen, el sobrenadante de cultivo celular se mezcló con aproximadamente 40 µl de suspensión al 50 % de proteína A-Sepharose y se incubó a 4 °C con balanceo durante 1 hora, después se centrifugó para sedimentar las microesferas de proteína A. Las microesferas se resuspendieron en 1 ml de PBS o tampón similar, se centrifugaron y se aspiró el tampón, y el proceso se repitió 1-2 veces. Las microesferas entonces se resuspendieron con tinte de carga de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) reductor o no reductor, se calentaron de 30 s a 5 min, se centrifugaron, y la proteína eluida en el tinte se cargó en geles de SDS-PAGE y se procesó de acuerdo con protocolos convencionales. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizaron transferencia de Western como se describe a continuación.

Para el análisis de todas las demás transfecciones estables, la proteína en primer lugar se purificó antes de analizarla en transferencias de Western. El FIX-Fc producido en CHO que se transfectó en solitario, con PACE, o PC7, se purificó sobre proteína A, se eluyó, se procesó en SDS-PAGE, se transfirió a nitrocelulosa y se realizaron transferencias de Western. El FIX-Fc producido en HEK con PC5, se sometió a purificación en tres columnas (véase a continuación) y se analizó de una manera similar.

Transferencia de Western de Fc

El anticuerpo usado para los experimentos de transferencia de Western de Fc fue un conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG humana (específica de Fc)-peroxidasa de rábano rústicano (anticuerpo Pierce ImmunoPure®, catálogo n.º 31416). Este anticuerpo se diluyó 1:10 000 en PBS-T (PBS con Tween-20 al 0,1 %) y se incubó con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con balanceo suave. Después de tres lavados de 10 minutos en PBS-T de aproximadamente 20 ml cada uno, se realizó detección quimioluminiscente.

Transferencia de Western de FIX

Para los experimentos de transferencia de Western de FIX, se usó un conjugado de anticuerpo de cabra anti-FIX humano-peroxidasa de rábano rústicano (Enzyme Research Laboratories, catálogo n.º FIX-EIA-130D). El anticuerpo se diluyó 1: 1000 en PBS-T y se incubó con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con balanceo suave. Después de tres lavados de 10 minutos de aproximadamente 20 ml cada uno, la membrana estaba lista para detección quimioluminiscente.

Transferencia de Western de propéptido de FIX

Para la transferencia de Western de propéptido, anticuerpo de conejo antipropéptido de FIX (véase el ejemplo 7) se diluyó 1: 10000 en PBS-T y se incubó con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con balanceo suave. La membrana posteriormente se puso en tres lavados de 10 minutos de aproximadamente 20 ml cada uno. El anticuerpo secundario (detección) fue un conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-peroxidasa de rábano rústicano (Southern Biotechnology Associates, catálogo n.º 4010-05) diluido 1:20 000 en PBS-T. El anticuerpo secundario se incubó con la membrana durante 30 minutos a 1 h a temperatura ambiente, y después se lavó tres veces en aproximadamente 20 ml de tampón PBS-T durante 15 minutos cada una en la preparación para la detección quimioluminiscente.

Detección quimioluminiscente

La detección de todas las inmunotransferencias se realizó usando el sistema de detección de transferencia de Western ECL Plus (Amersham Biosciences catálogo n.º RPN2132) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La visualización de la señal se realizó en un Storm 840 Phosphorimager (Molecular Devices).

5 Ejemplo 10

Sumario de experimentos de procesamiento de propéptido: Transferencia de Western

Las transfecciones transitorias en células CHO indicó inicialmente que, aunque FIX-Fc transfectado en solitario retenía el propéptido, la cotransfección de FIX-Fc con PC5, PACE-SOL, PC7-SOL o KEX2-SOL era suficiente para retirar completamente el propéptido. Como se muestra en la figura 4, las transferencias de Western de FIX (paneles superiores) y propéptido de FIX (paneles inferiores) de transfecciones transitorias en células CHO indicaron inicialmente que FIX-Fc transfectado en solitario retenía el propéptido (bandas presentes en transferencias de Western tanto de FIX como de propéptido, carriles 1 y 5). En contraste, las transferencias de Western de transfecciones transitorias en células CHO inicialmente indicaron que la cotransfección de FIX-Fc con PC5 (carril 4), PACE-SOL (carriles 2 y 6), PC7-SOL (carriles 3 y 7), o KEX2-SOL (carril 8) era suficiente para retirar completamente el propéptido (bandas presentes en transferencias de Western de FIX, pero no de propéptido). Obsérvese, sin embargo, que la cotransfección con KEX2-SOL (carril 8) produjo una banda adicional más pequeña que contenía FIX (panel superior), probablemente debido a la escisión críptica por esta enzima más promiscua (Rockwell *et al.* (2002) Chem. Rev. 102: 4525-48) en un sitio adicional en FIX.

La figura 5 demuestra que, en líneas celulares CHO transfectadas de forma estable, PACE-SOL puede procesar completamente el propéptido, mientras que PC7-SOL no. Se hizo una comparación entre material purificado con proteína A de una línea celular CHO que expresaba de forma estable dímero de FIX-Fc, monómero y Fc, cotransfectada con PACE-SOL o PC7-SOL. Empezando con la cotransfección con PACE-SOL, el carril 1 del gel de SDS-PAGE en el panel A identifica las tres especies, el carril 1 del Western de FIX en el panel B confirma que las bandas de dímero y monómero contienen FIX, y el carril 1 del Western de propéptido en el panel C demuestra (por la ausencia de bandas) que el propéptido se procesa completamente por PACE. En contraste, con respecto a la cotransfección con PC7-SOL, el carril 2 del gel de SDS-PAGE en el panel A de nuevo identifica las tres especies, el carril 2 del Western de FIX en el panel B de nuevo confirma que las bandas de dímero y monómero contienen FIX, pero el carril 2 del Western de propéptido en el panel C demuestra (por la presencia de bandas) que el propéptido aún está presente en el dímero y monómero de FIX-Fc cotransfectado con PC7-SOL.

La figura 6 demuestra que, en líneas celulares CHO transfectadas de forma estable, PC5 puede procesar completamente el propéptido. En la figura 6, los carriles 1, 2, y 3 muestran los resultados de Western de FIX (panel superior) y Western de propéptido (panel inferior) para extracciones con proteína A de líneas celulares que expresan de forma estable dímero de FIX-Fc, monómero y Fc cotransfectado con PC5. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a líneas celulares estables amplificadas con 25, 50 y 100 nM de metotrexato; respectivamente. En el Western de FIX, se indican las bandas de dímero y monómero de FIX-Fc, y la banda de Fc no reacciona. El Western de propéptido confirmó que las bandas de dímero y monómero no tienen propéptido (no se encuentran bandas significativas). En la figura 6, los carriles 4 y 5 muestran los resultados de Western de FIX (panel superior) y Western de propéptido (panel inferior) para extracciones con proteína A de controles, líneas celulares CHO transfectadas con FIX-Fc en solitario (carril 4) o FIX-Fc junto con PACE-SOL (carril 5). Como se muestra en el carril 5, el FIX-Fc purificado de líneas celulares CHO transfectadas con PACE-SOL (carril 5) se procesa completamente (obsérvese la presencia de bandas fuertes en Western de FIX, panel superior, pero solamente bandas de fondo débiles en el Western de propéptido, panel inferior). En contraste, el carril 4 muestra que el propéptido aún está presente en FIX-Fc purificado de líneas celulares CHO sin ninguna enzima de procesamiento cotransfectada (obsérvese la presencia de bandas fuertes en Western tanto de FIX como de propéptido, paneles superior e inferior, respectivamente).

En resumen, el examen de las líneas celulares CHO transfectadas de forma estable demostró que solamente PACE-SOL (figura 5) y PC5 (figura 6) pueden procesar completamente el propéptido, mientras que FIX-Fc transfectado en solitario (figura 6) o con PC7-SOL (figura 5) producía proFIX-Fc.

La capacidad de estas diversas enzimas de retirar el propéptido también se examinó en células HEK 293. La figura 7 muestra que PC5, pero no PC7-SOL, retiraba completamente el propéptido de FIX-Fc derivado de células HEK 293 transfectadas de forma transitoria. Para los resultados mostrados en la figura 7, las células HEK 293-H se transfectaron de forma transitoria con FIX-Fc y Fc en solitario; FIX-Fc, Fc y PC5; o FIX-Fc, Fc y PC7-SOL. Los medios acondicionados resultantes se sometieron a extracciones con proteína A, SDS-PAGE reductor y transferencia de Western de Fc (panel izquierdo) o transferencia de Western de propéptido (panel derecho). Como se muestra en la figura 7, la proteína FIX-Fc derivada de transfecciones sin ninguna enzima de procesamiento retenía el propéptido (carriles 3, "-"), igual que FIX-Fc cotransfectado con PC7-SOL (carriles 8-11, de transfecciones realizadas por cuadruplicado), como puede observarse por las bandas presentes en Western tanto de Fc como de propéptido. En contraste, PC5 retiró completamente el propéptido (carriles 4-7 de transfecciones realizadas por cuadruplicado), como se indica por las bandas presentes solamente en las transferencias de Western de Fc, pero no en las de propéptido. Como controles para estos Western, se analizó dímero de FIX-Fc purificado de células CHO transfectado en solitario (carriles 1) o con PACE-SOL (carriles 2). El propéptido estaba presente en FIX-Fc transfectado sin ninguna enzima de

procesamiento (bandas en los carriles 1 de ambos Western), pero ausente en FIX-Fc cotransfectado con PACE-SOL (carriles 2, banda presente en Western de Fc, pero solamente banda de fondo débil Western de propéptido).

La figura 8 muestra que KEX2-SOL no podía procesar proFIX-Fc derivado de células HEK 293 transfectadas de forma transitoria con FIX-Fc. Los medios acondicionados de células HEK 293 transfectadas de forma transitoria con FIX-Fc, Fc y KEX2-SOL se sometieron a extracciones con proteína A y SDS-PAGE no reductor y transferencia de Western de Fc (panel superior) o SDS-PAGE reductor y transferencia de Western de propéptido (panel inferior). Como se muestra en la figura 8, FIX-Fc cotransfectado con KEX2-SOL no se procesa, como puede observarse por la presencia de propéptido en este material (carriles 3 y 4, bandas presentes en ambas transferencias). El material del carril 3 tiene Fc natural en las tres especies (dímero, monómero y Fc en solitario), mientras el material del carril 4 tiene N297A Fc. Como controles, se analizó dímero de FIX-Fc purificado de células CHO transfectado en solitario (carril 1) o con PACE-SOL (carril 2), confirmando que el propéptido estaba presente en FIX-Fc transfectado sin ninguna enzima de procesamiento (bandas en ambos Western, carril 1), pero ausente en FIX-Fc cotransfectado con PACE-SOL (carril 2, banda presente en Western de Fc, pero solamente banda de fondo en Western de propéptido).

En resumen, en células HEK 293 transfectadas de forma transitoria, solamente PC5 demostró la capacidad de retirar completamente el propéptido (figura 7), mientras que PC7-SOL (figura 7) y KEX2-SOL (figura 8) no pudieron procesar proFIX-Fc, similar a FIX-Fc transfectado sin ninguna enzima de procesamiento (figura 7).

La capacidad de estas enzimas de retirar el propéptido también se examinó en células HEK 293 transfectadas de forma estable. La figura 9 demuestra que, en líneas celulares transfectadas de forma estable, PC5 puede procesar completamente el propéptido. Se procesaron por duplicado dos lotes de monómero de FIX-Fc purificado (véase el ejemplo 11 para el proceso de purificación) de una línea celular HEK 293-H que expresaba de forma estable dímero de FIX-Fc, monómero y Fc cotransfectado con PC5 (carriles 4a/b y 5a/b) en un gel de SDS-PAGE en condiciones no reductoras, después se transfirieron a transferencias y se sondearon con anticuerpos contra FIX (figura 9B) o propéptido (figura 9C). El gel entonces se tiñó después de transferencia con Gelcode Blue (Pierce, Rockford, IL) (figura 9A). El análisis de las figuras demuestra que el propéptido se procesaba completamente por PC5, como se indica por la ausencia de bandas en el panel C, Western de propéptido, carriles 4b y 5b. Como puede observarse del panel A, los carriles 4a/b y 5a/b estaban todos cargados con cantidades iguales de proteína, confirmados que eran dímero y monómero de FIX-Fc, como puede observarse en el panel B, carriles 4a y 5a. Como controles, se analizó dímero de FIX-Fc, monómero y Fc purificados con proteína A de líneas celulares CHO cotransfectadas con PACE-SOL (carriles 1a/b) o PC7-SOL (carriles 2a/b). Estos controles confirmaron que el propéptido estaba presente en el material cotransfectado con PC7 (bandas presentes en el panel C, carril 2b, así como el panel B, carril 2a), pero no PACE-SOL (bandas ausentes en el panel C, carril 2b, pero presentes en el panel B, carril 2a).

La figura 10 demuestra que, en contraste con PC5, PC7-SOL no podía procesar el propéptido en líneas celulares HEK 293 transfectadas de forma estable. Como se muestra en la figura 10, los medios de células HEK 293-H transfectadas de forma estable con FIX-Fc y Fc en solitario, o con FIX-Fc, Fc y PC7-SOL, se sometieron a extracciones con proteína A y se analizaron por SDS-PAGE reductor y transferencia de Western de Fc (panel superior) o transferencia de Western de propéptido de FIX (panel inferior). Las células se transfectaron con la versión N297A de FIX-Fc y Fc en relaciones iguales (carriles 3 y 5) o en una relación 1:8 (carriles 4 y 6) de plásmidos de expresión de FIX-Fc a Fc, respectivamente, en solitario (carriles 3 y 4) o con 1/10 del ADN total del plásmido de expresión de PC7-SOL (carriles 5 y 6). Estos análisis mostraron que la proteína FIX-Fc retiene el propéptido se transfectara de forma estable con (carriles 5 y 6) o sin (carriles 3 y 4) PC7-SOL, como puede observarse por las bandas tanto en la transferencia de Western de Fc (panel superior) como la transferencia de Western de propéptido (panel inferior). Como controles para estos Western, se analizó dímero de FIX-Fc purificado de células CHO transfectado en solitario (carril 1) o con PACE-SOL (carril 2), confirmando que el propéptido estaba presente en FIX-Fc transfectado sin ninguna enzima de procesamiento (bandas en ambos Western, carril 1), pero ausente en FIX-Fc cotransfectado con PACE-SOL (carril 2, banda presente en Western de Fc, pero solamente banda de fondo débil en Western de propéptido).

En resumen, las líneas celulares HEK 293 estables parecían idénticas a las transfecciones transitorias, puesto que PC5 podía procesar completamente el propéptido (figura 9) mientras que PC7 no (figura 10).

La tabla 2 a continuación resume los resultados de las diferentes combinaciones de enzimas de procesamiento y proteínas FIX-Fc que se evalúan por transferencia de Western.

Tabla 2. Procesamiento de propéptido

Célula	Transfección	PC5	Kex2	PC7	PACE	PACE 4
CHO	transitoria	procesa, figura 4	procesa (escisión crítica), figura 4	procesa, figura 4	procesa, figura 4	
	estable	procesa, figura 6	no realizado	no procesa completamente, figura 5	procesa, figura 5, 6	no procesa completamente*

Célula	Transfección	PC5	Kex2	PC7	PACE	PACE 4
HEK	transitoria	procesa, figura 7	no procesa completamente, figura 8	no procesa completamente, figura 7	no realizado	
	estable	procesa, figura 9	no realizado	no procesa completamente, figura 10	no realizado	

* Wasley LC *et al.* (1993) J Biol Chem. 268:8458-65.

Ejemplo 11

Purificación de proteínas

5

Cromatografía con proteína A

10

15

Una columna de 5 cm x 6 cm de altura de lecho (117 ml de volumen, columna XK 5, Amersham) se compactó con medio MabSelect de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La columna se equilibró con PBS y después se cargó con el medio concentrado a 150 cm/h, proporcionando un tiempo de retención de 2,4 minutos. Después de la carga, la columna se lavó en primer lugar con 3-4 volúmenes de PBS, después 3-4 volúmenes de PBS + NaCl 0,9 M. Finalmente, se redujo la conductividad con 3 volúmenes de PBS antes de la elución. La proteína unida eluyó con 3-4 volúmenes de citrato de sodio 25 mM + NaCl 150 mM, pH 3,4. Después de la elución, la columna se destiló con guanidina HCl 3 M. El material eluido se neutralizó con base Tris 2 M (~8 ml por 100 ml de eluido). La cantidad de proteína eluida se estimó midiendo las diluciones triplicadas de la combinación neutralizada (1 en 10) en PBS. La concentración se determinó usando la ecuación

$$\text{mg/ml} = (\text{absorbancia } 280 - \text{absorbancia } 320)/1,34$$

20

donde 1,34 es el coeficiente de absorbancia molar teórica en función del número de triptófanos, tirosinas y enlaces disulfuro en monómero de FIX-Fc. Gill *et al.* (1989) Analytical Biochem 182:319.

Cromatografía de intercambio aniónico usando Fractogel DEAE

25

El eluido de proteína A neutralizado se diluyó 1:1 con Tris 25 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5, y se cargó en una columna Fractogel DEAE de 2,6 cm x 7 cm de altura de lecho (37 ml de volumen, columna XK 2.6, Amersham). La columna Fractogel DEAE se compactó de acuerdo con las especificaciones del fabricante, que incluía una compresión de lecho de un 25 % después de compactación por alto flujo.

30

La columna se equilibró con 6 volúmenes de columna (CV) de Tris 25 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5, y se cargó a ~230 cm/h. La carga se lavó con 4 CV de tampón de equilibrado seguido de 4 CV de Tris 25 mM + acetato de amonio 350 mM, pH 7,5, seguido de 3 CV de tampón de equilibrado.

35

El monómero de FIX-Fc eluyó con Tris 25 mM + acetato de amonio 600 mM, pH 7,5 (~5 CV). La columna entonces se separó con 5 volúmenes de hidróxido de sodio 0,1 M, seguido de reequilibrado con 4 CV de Tris 25 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5.

Cromatografía de pseudoafinidad usando Q Sepharose FF

40

La cromatografía de intercambio aniónico de pseudoafinidad implica CaCh en elución del FIX-Fc inmovilizado de la columna. Se cree que la adición de CaCl₂ provoca un cambio conformacional en la parte de FIX de la molécula, que provoca que eluya del medio Q Sepharose FF. Yan SB *et al.* (1996) J Mol Recognit. 9:211-8; Harrison S *et al.* (1998) Semin Hematol 35(2 Suppl2):4-10.

45

El eluido de DEAE se diluyó un total de 4 veces con Tris 25 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5. Una columna Q Seph FF de 1,6 cm x 11 cm de altura de lecho (22 ml de volumen, columna XK 1.6; Amersham) se equilibró con Tris 25 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5 (9 CV). La columna entonces se cargó a 200 cm/h y se lavó con 15 CV de tampón de equilibrado. Para garantizar la unión adecuada de las especies activas de FIX-Fc, la carga de DEAE de nuevo material se diluye ahora 1:4 con Tris 25 mM + NaCl 120 mM, pH 7,5, que ahora será el tampón de equilibrado de la columna. El resto del procedimiento permanece igual.

50

La especie de monómero de FIX-Fc más activa eluyó con Tris 25 mM + CaCl₂ 7 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 CV). Las especies menos activas eluyeron con Tris 25 mM + CaCl₂ 10 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5 (5 CV), mientras el material de FIX-Fc menos activo eluyó con Tris 25 mM + acetato de amonio 600 mM, pH 7,5.

55

El pico de rFIX-Fc se recogió desde el inicio de la elución (la señal de UV alcanza ~100 mAU) hasta cuando la señal de UV alcanza un 20 % de la absorbancia máxima de pico en el extremo posterior del pico de elución (~30 ml).

5 La columna entonces se separó con hidróxido de sodio 0,1 M (5 CV) y después se reequilibró con Tris 25 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5.

Intercambio de tampón de preparación de proteína final

10 Se intercambió el tampón de las fracciones de elución de Q Seph FF frente a PBS. La proteína se inyectó en Slide-A-lyzers (Pierce) de 125 ml prehumedecidos y se dializó frente a dos cambios de tampón PBS, cada vez en exceso de 200 veces de PBS sobre la solución de proteína.

Ejemplo 12

15 **Análisis de línea celular estable y cartografiado de péptidos**

Para el cartografiado de péptidos, se realizaron digestiones tripsínicas y los péptidos resultantes se analizaron por LC/MS para determinar la presencia de un fragmento del propéptido denominado péptido indicador de propéptido, o PIP (TVFLDHENANK; SEQ ID NO:18), que solamente estaría presente en caso de procesamiento incompleto del propéptido.

20 Se secaron aproximadamente 100-200 µg de proteína con un Speed Vac, después se resuspendieron en 100-200 µl de tampón de digestión (bicarbonato de amonio 50 mM) usando una termomezcladora Eppendorf a 30 °C, 800 rpm, durante 30 min. La muestra entonces se redujo añadiendo 10 µl de agente reductor (ditiotreitól 10 mM en tampón de digestión) durante 30 min a 56 °C, 800 rpm en la termomezcladora. La muestra se dejó enfriar, después se añadieron 10 µl de agente de alquilación (yodoacetamida 55 mM en tampón de digestión) y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después se añadió tripsina modificada de calidad de secuenciación Promega a 0,1 µg/µl en bicarbonato de amonio 50 mM a relación ponderal de 100:1 a 200:1 de sustrato a enzima, después se incubó a 37 °C, 800 rpm durante 16 horas. La muestra se secó con un Speed Vac según lo necesario para reducir el volumen, y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que estuvieron listas para el análisis, como se describe a continuación.

Análisis de HPLC-UV - Materiales y equipo:

- 35 • Bomba de HPLC binaria Agilent 1100 con tomamuestras automático termostregulado, detector de matriz de diodos y calentador de columna
- Columna de HPLC Phenomenex Jupiter, 250 mm × 2,00 mm, C18, 300 Å, 5 µm dp
- 40 • Tampón A: 0,01 % (v/v) de ácido trifluoroacético, 0,05 % (v/v) de ácido fórmico. (agua de calidad de HPLC propia, reactivos de calidad analítica)
- Tampón B: Tampón A en 85 % de acetonitrilo de calidad de HPLC

45 **Análisis de HPLC-UV-MS - Materiales y equipo:**

- Bomba de HPLC binaria Agilent 1100 con tomamuestras automático termostregulado, detector de matriz de diodos y calentador de columna
- 50 • Espectrómetro de masas con retención de iones Thermo Finnigan
- Columna de HPLC Phenomenex Jupiter, 250 mm × 2,00 mm, C18, 300 Å, 5 µm dp
- Tampón A: 0,01 % (v/v) de ácido trifluoroacético, 0,05 % (v/v) de ácido fórmico. (agua de calidad de HPLC propia, reactivos de calidad analítica)
- 55 • Tampón B: Tampón A en 85 % de acetonitrilo de calidad de HPLC

Análisis de HPLC-UV - Procedimiento:

- 60 • Programa de gradiente:

Tiempo, min	% de disolvente B
0,00	5,6

Tiempo, min	% de disolvente B
25,00	16,8
50,00	21,3
71,00	29,0
91,00	32,5
125,00	44,7
130,00	100
140,00	100
140,10	5,6
155,00	5,6

- Caudal: 0,250 ml/min;
- Detección: Detector de matriz de diodos, UV, 214 nm y 280 nm;
- Temperatura de la columna: 30 °C.

Análisis de HPLC-UV-MS - Procedimiento:

- Programa de gradiente, caudal, temperatura de la columna y detección de UV como anteriormente.
- Detección MS: Un espectrómetro de masas con retención de iones Thermo Finnigan LCQ Advantage conectado en línea después del detector de matriz de diodos y manejado en modo de ionización por electronebulización (ESI). Los protocolos de espectrometría de masas variaron dependiendo del objetivo del análisis, pero habitualmente fueron "funcionamiento triple" (exploración completa, exploración ampliada y exploración MSMS, secuencial) para la identificación de péptidos o exploración completa solamente para producir cromatogramas de masas.

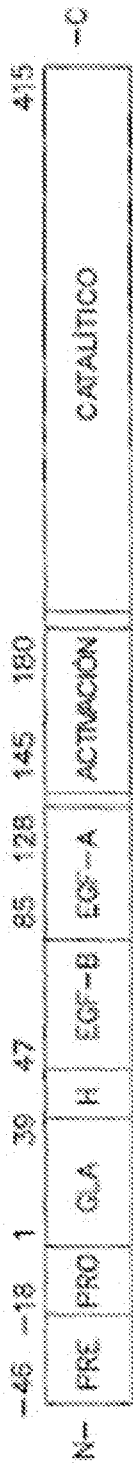
Ejemplo 13

Sumario de experimentos de procesamiento de propéptido: Cartografiado de péptidos

Los resultados de transferencia de Western de las proteínas transfectadas forma estable se confirmaron por cartografiado de péptidos. El péptido indicador de propéptido (PIP) se detectó en el trazado de UV y el trazado de ion seleccionado en FIX-Fc transfectado en solitario en CHO, pero fue indetectable en monómero de FIX-Fc purificado cotransfectado con PC5 (figura 11). ProFIX-Fc también se encontró en proteína FIX-Fc en CHO, que se cotransfectó con PC7, aunque posiblemente a niveles menores como se indica en el trazado de UV (figura 12). El FIX en solitario producido en presencia de PACE-SOL (BeneFIX®) parecía idéntico al monómero de FIX-Fc producido PC5 (figura 13), que no presenta PIP detectable.

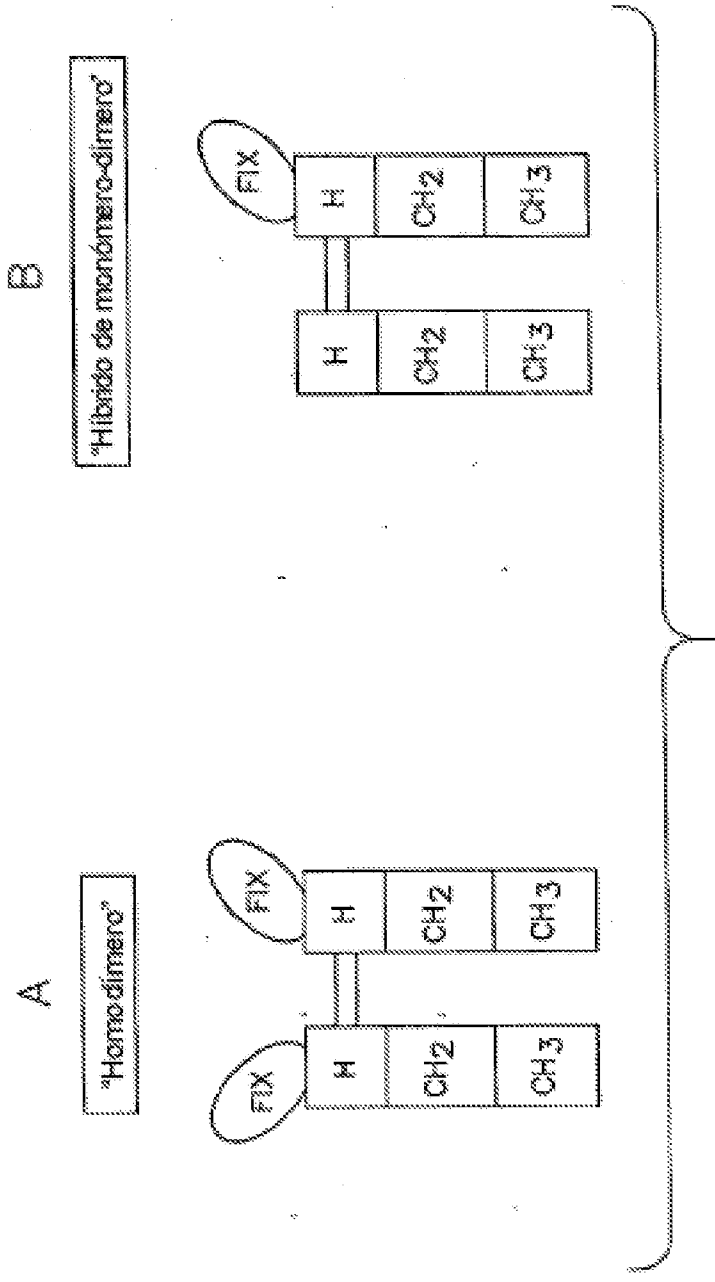
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula hospedadora que comprende un primer polinucleótido que codifica una proproteína de factor IX (proFIX), o una proteína de fusión de la misma, y un segundo polinucleótido que codifica una proproteína convertasa similar a subtilisina/Kex2p de mamífero funcional (PC5).
- 10 2. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en donde la PC5 funcional comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 1.
- 15 3. La célula hospedadora de la reivindicación 1 o 2, en donde el primer polinucleótido codifica proFIX.
- 20 4. La célula hospedadora de la reivindicación 1 o 2, en donde el primer polinucleótido codifica una proteína de fusión de proFIX.
- 25 5. La célula hospedadora de la reivindicación 4, en donde el primer polinucleótido codifica una proteína de fusión de proFIX-Fc, una proteína de fusión de proFIX-albúmina o una proteína de fusión de proFIX-transferrina.
- 30 6. La célula hospedadora de la reivindicación 5, en donde la célula hospedadora produce un híbrido de monómero-dímero de proFIX-Fc.
- 35 7. La célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la proteína de fusión comprende un conector.
- 40 8. La célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el primer polinucleótido que codifica la proFIX o la proteína de fusión de la misma y el segundo polinucleótido que codifica la PC5 funcional están en un solo vector de expresión.
9. Un método *in vitro* para producir un polipéptido que contiene factor IX maduro a partir de una proFIX, o una proteína de fusión de la misma, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en condiciones que permiten: la expresión tanto de proFIX o la proteína de fusión de la misma como de PC5 funcional, y procesar la proFIX o la proteína de fusión de la misma por la PC5 funcional.
10. Un método *in vitro* para aumentar el rendimiento de un polipéptido que contiene factor IX maduro a partir de una proFIX, o una proteína de fusión de la misma, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en condiciones que permiten: la expresión tanto de proFIX o la proteína de fusión de la misma como de PC5 funcional, y procesar la proFIX o la proteína de fusión de la misma por la PC5 funcional, en donde el rendimiento del polipéptido que contiene factor IX maduro está aumentado en comparación con el rendimiento del polipéptido que contiene factor IX maduro producido en condiciones similares sin el procesamiento por la PC5 funcional.
11. La célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el método de la reivindicación 9 o 10, en donde la célula hospedadora es una célula procariótica.



- * Prepro péptido: secuencia señal, importación a ER para secreción.
- * Pro péptido: se une a 7-carboxilasa dependiente de vitamina K, se escinde durante la secreción.
- * Dominio Gla: contiene 12 residuos de ácido glutámico 7-carboxilados (modificados por 7-carboxilasa VKC), confiere afinidad por membranas fosfolípidicas, necesaria para la unión a superficies de células endoteliales.
- * Aglutinamiento heparínico: EGF-B, EGF-A, catalítico; dominios funcionales.
- * Péptido de activación: escindido para producir proteasa activa, FIXc; las cadenas FIX(1-145) y FIX (181-145) permanecen asociadas a través de un solo enlace disulfuro.

FIG. 1



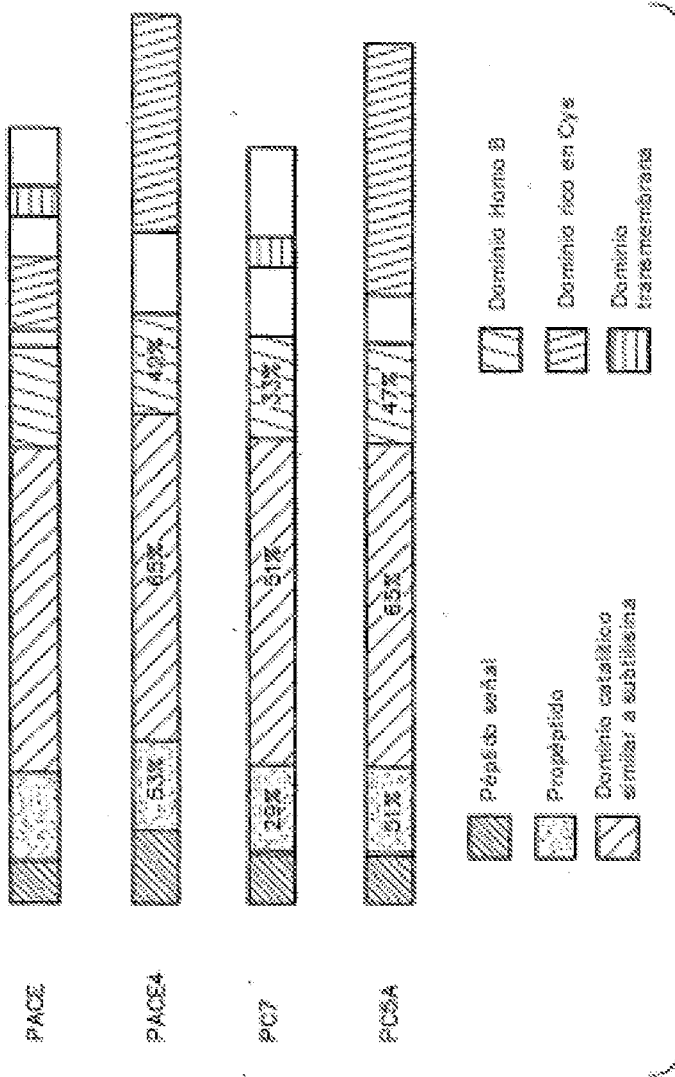


FIG. 3

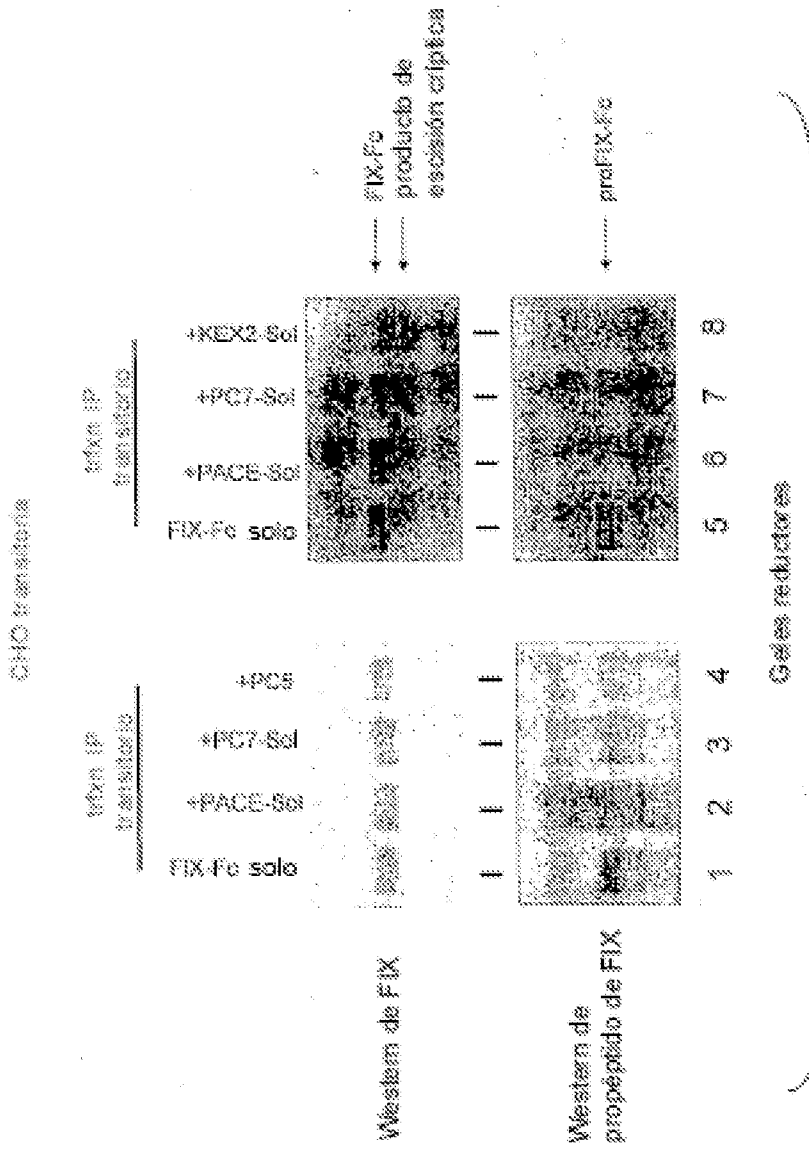


FIG. 4

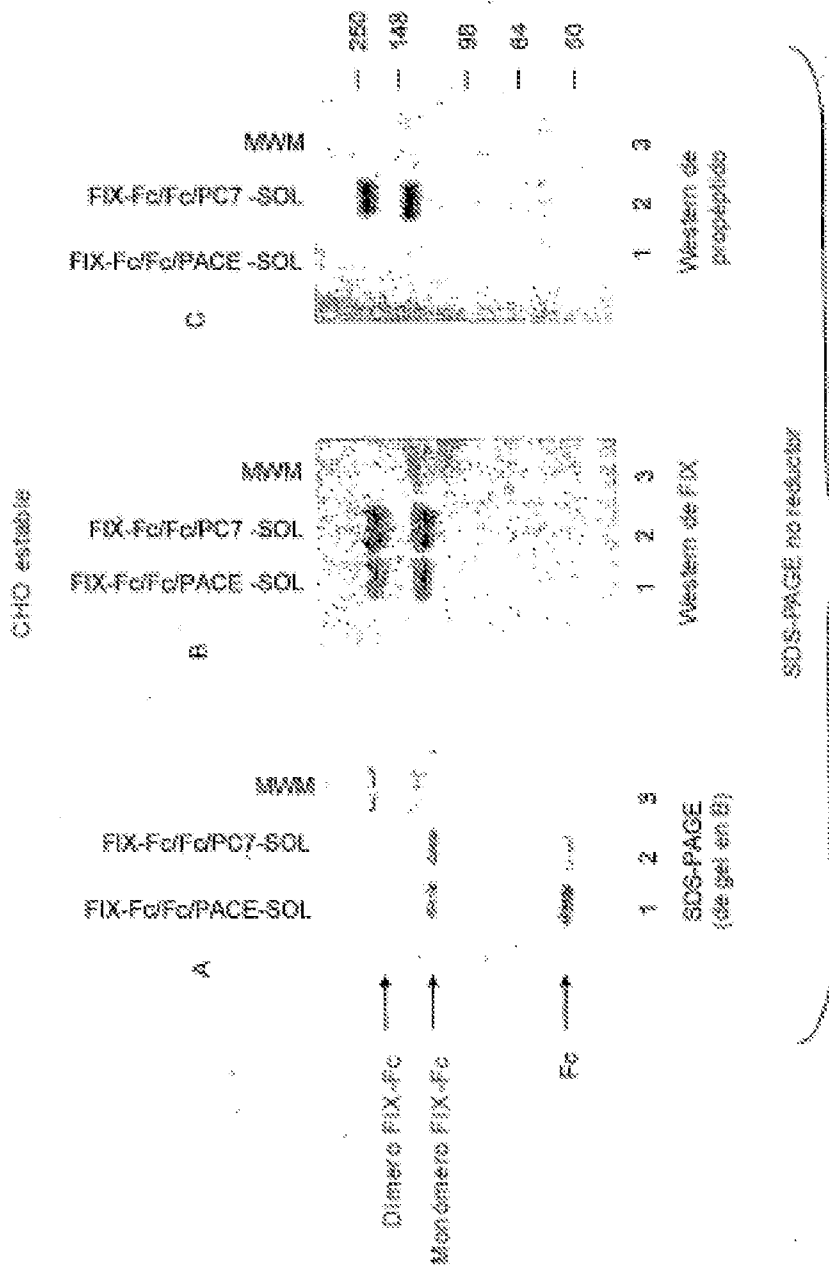
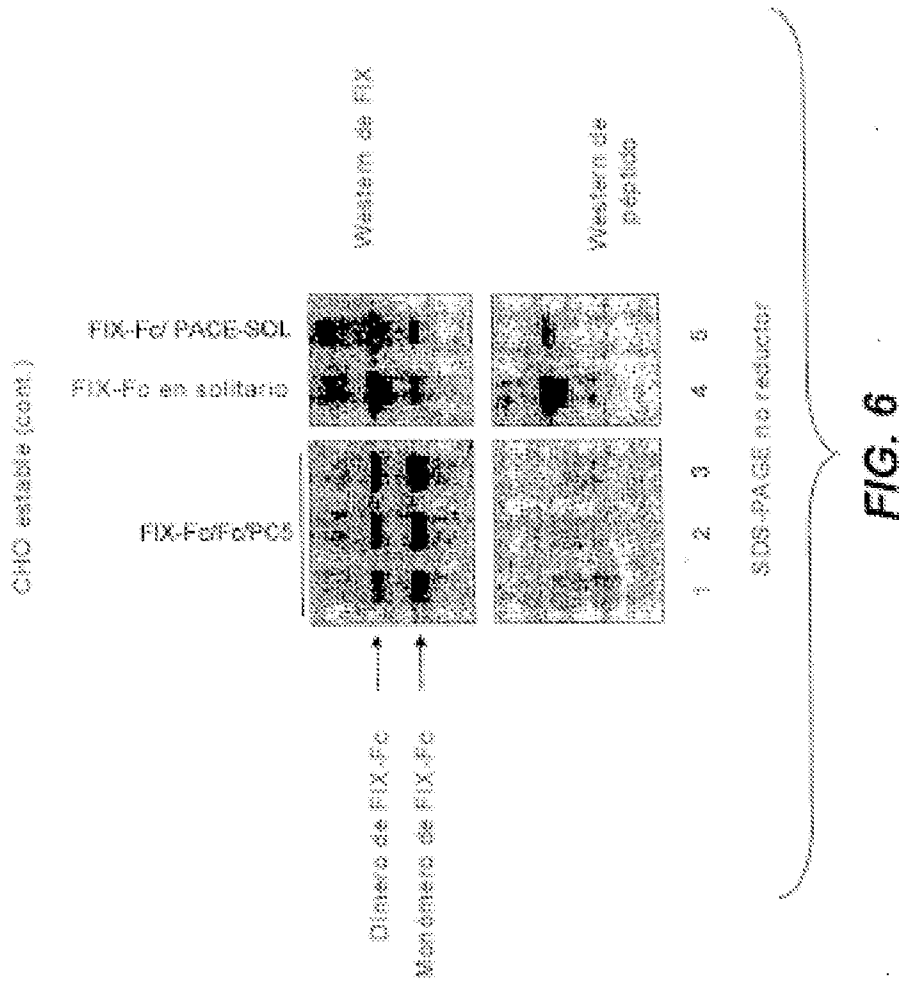


FIG. 5



HEK transitoria

Carril 1 = CHO FIX-fc/ sin enzima de procesamiento
 Carril 2 = CHO FIX-fc/PAGE -SOL

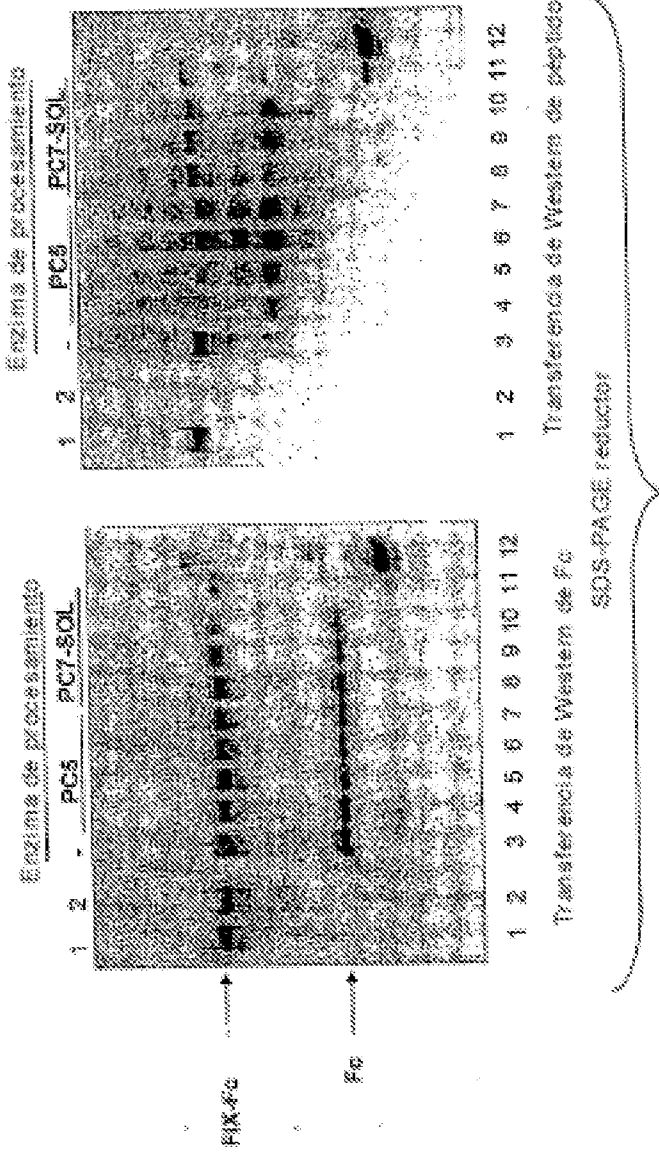


FIG. 7

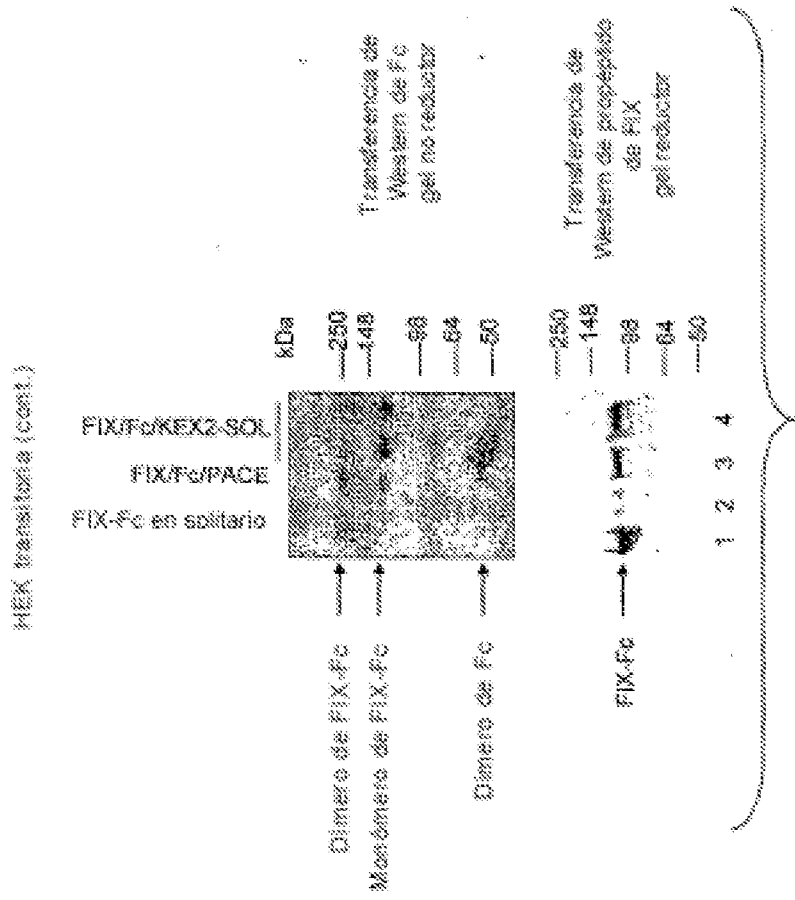


FIG. 8

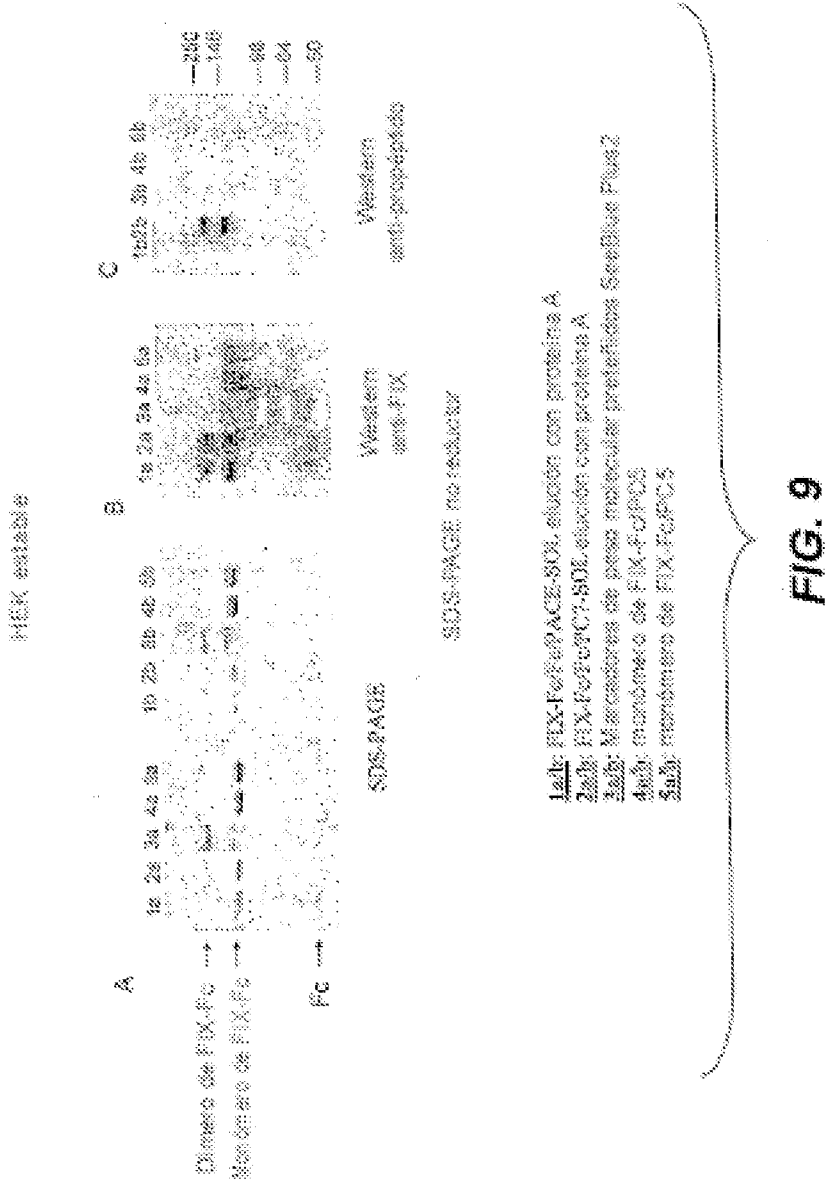


FIG. 9

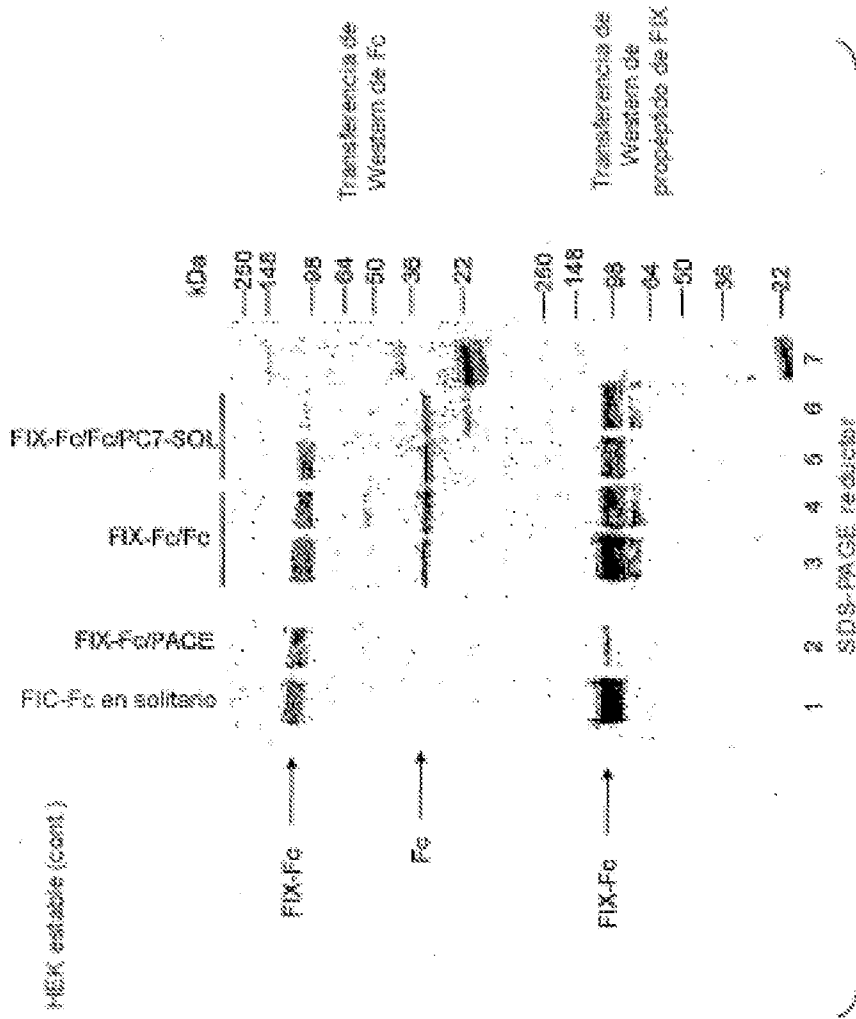


FIG. 10

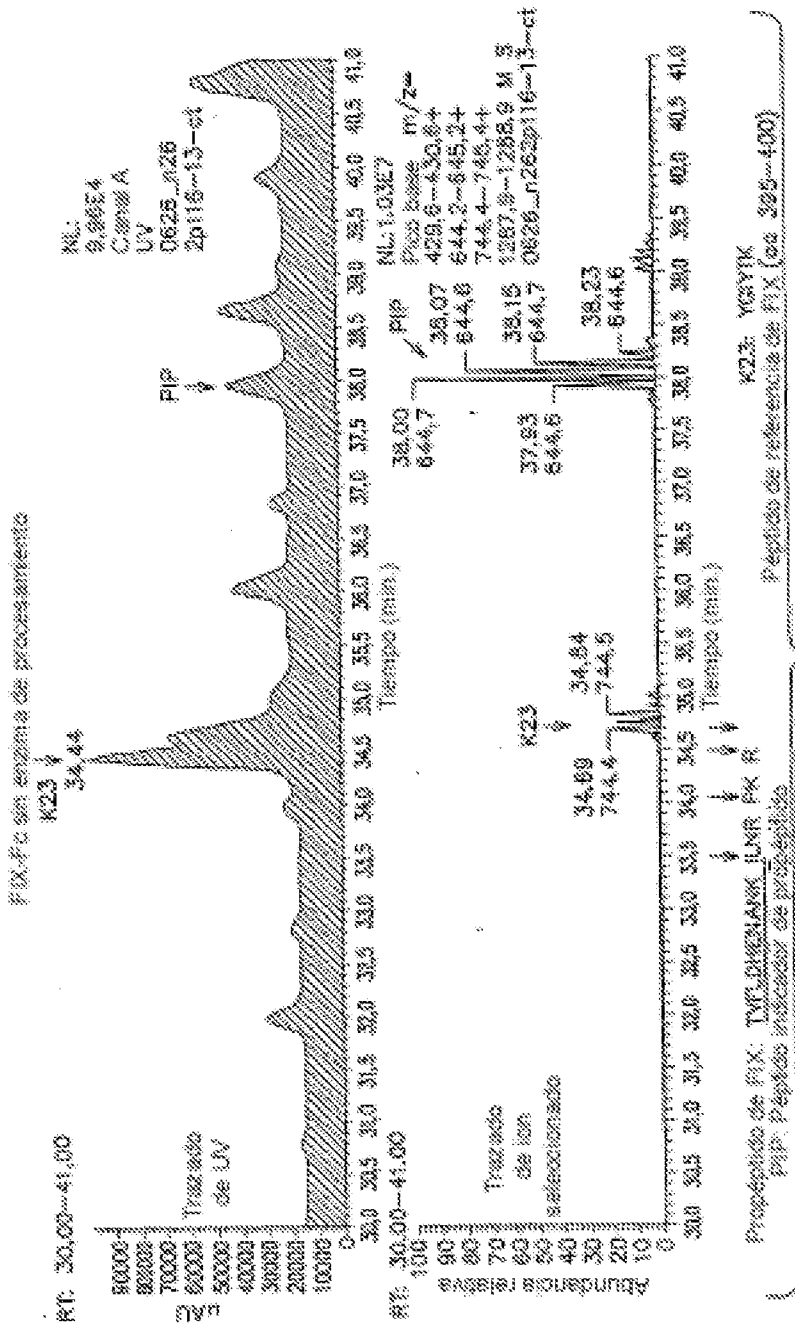


FIG. 11A

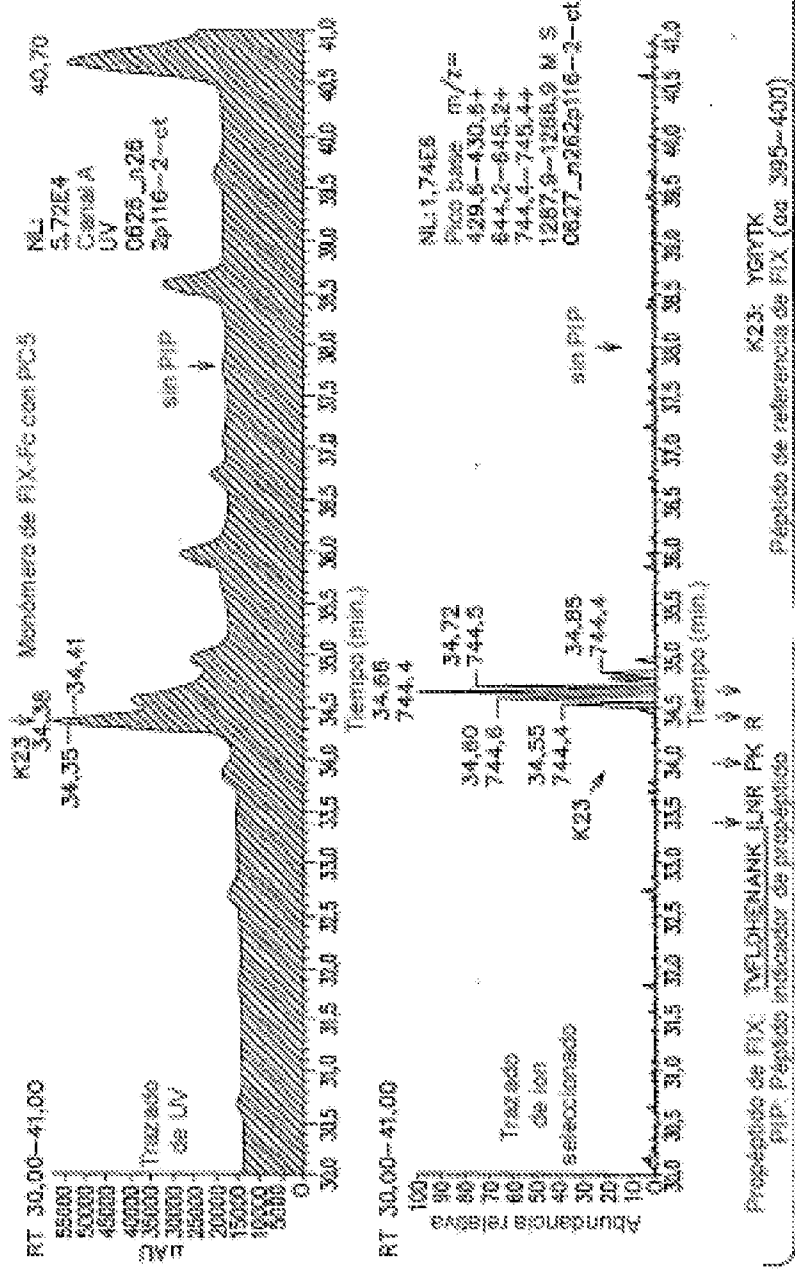


FIG. 11B

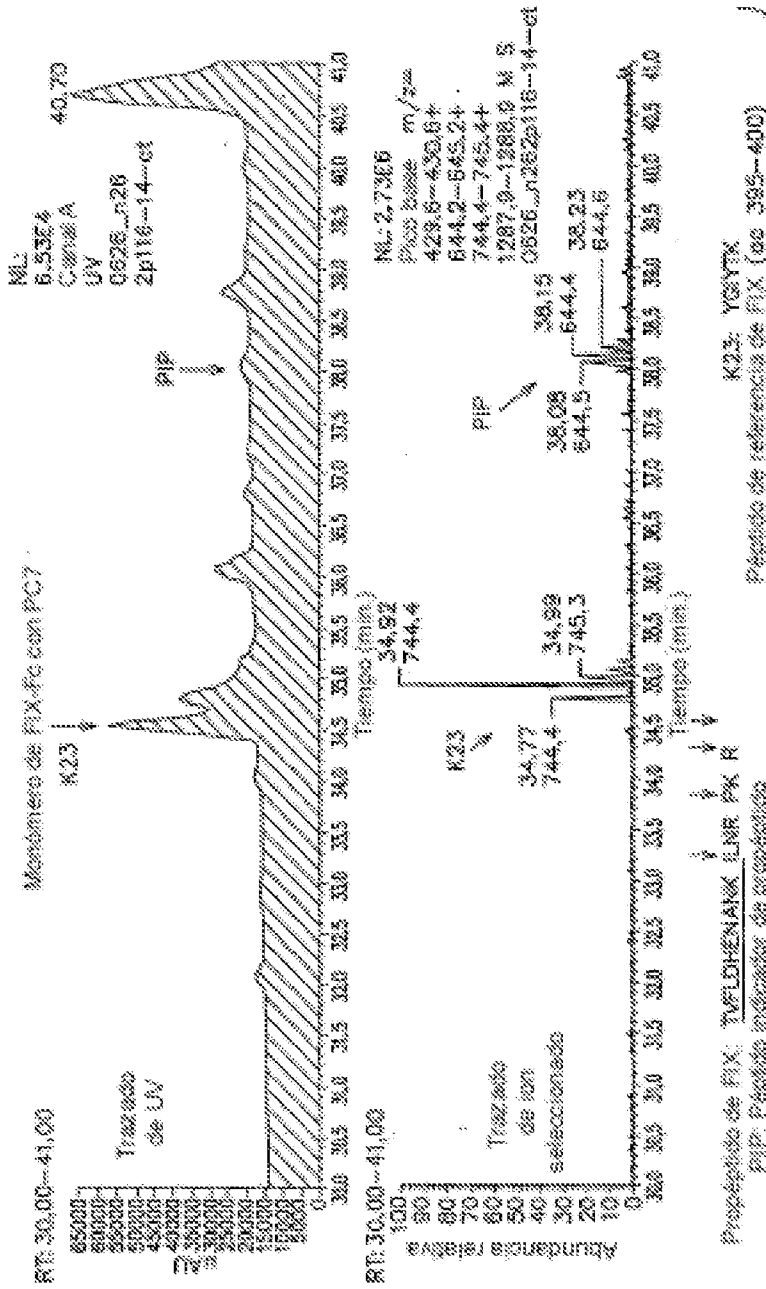


FIG. 12A

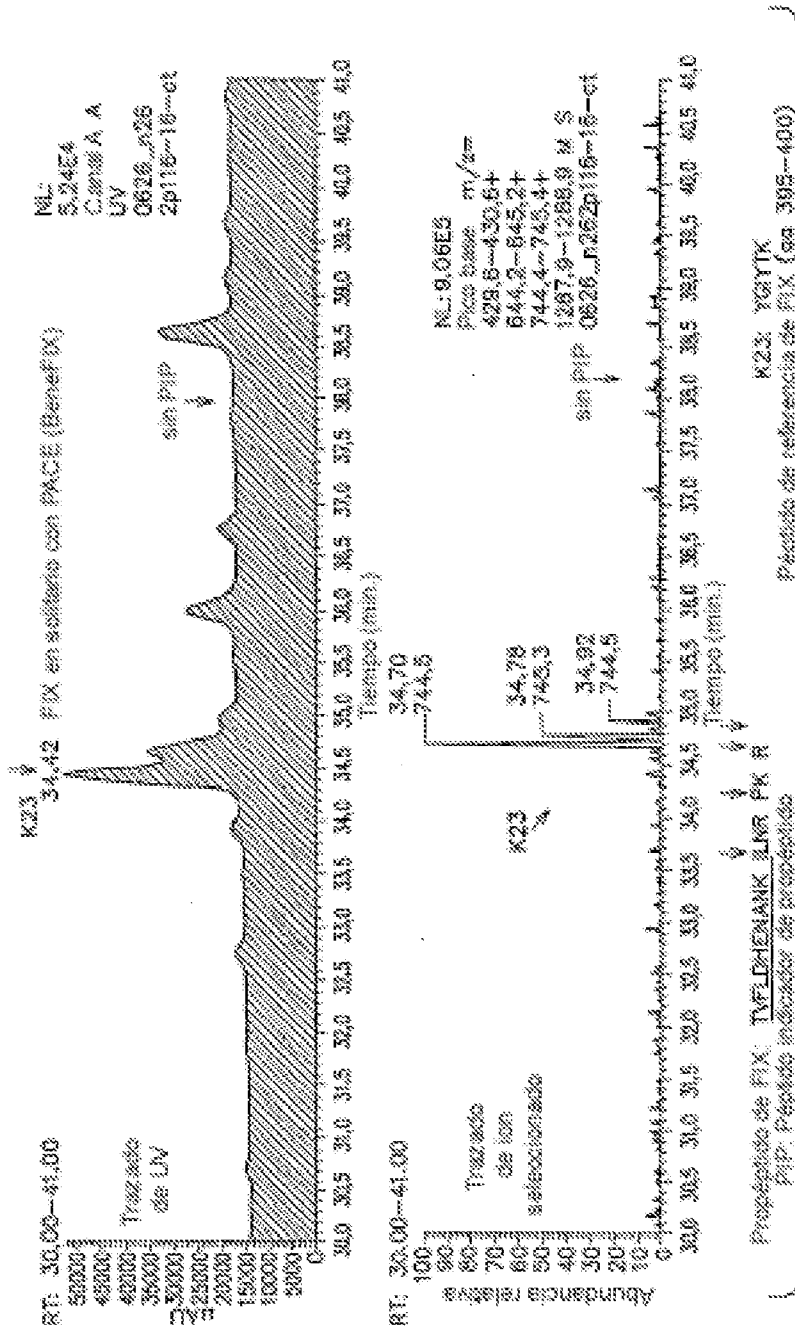


FIG. 13A

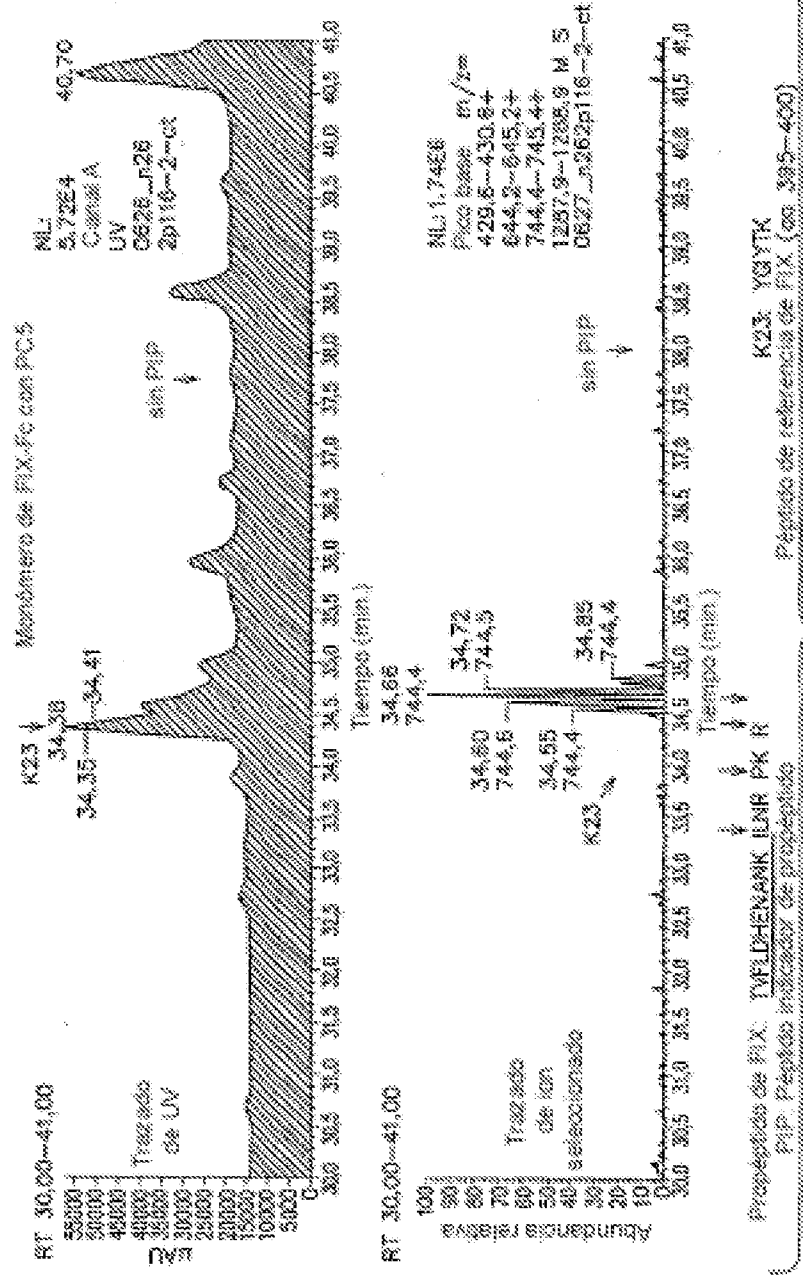


FIG. 13B